



Ribonucleoside somministrato terapeuticamente blocchi analogici MK-4482 / EIDD-2801 Trasmissione di SARS-CoV-2 nei furetti

Robert M. Cox^{1,2}, Josef D. Wolf^{1,2} e Richard K. Plemper¹ ✉



La pandemia della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) sta avendo topi non infetti^{1a}. Spill-back di SARS-CoV-2 ai visoni d'allevamento, un impatto catastrofico sulla salute umana¹. Comunità 'diffusa' La trasmissione nità ha attivato rigorose misure di distanziamento casi, la trasmissione zoonotica all'uomo si è rivelata efficiente con gravi conseguenze socioeconomiche. Ottenere il controllo della pandemia dipenderà dall'interruzione delle catene di trasmissione fino a quando non si manifesta l'immunità protettiva della mandria indotta dal vaccino o acquisita naturalmente. Tuttavia, i trattamenti antivirali approvati come il remdesivir e il siero riconvalescente non possono essere somministrati per via orale^{2,3}, rendendoli poco adatti per il controllo della trasmissione. Abbiamo precedentemente segnalato lo sviluppo di un inibitore dell'analogo ribonucleoside del virus influenzale, efficace per via orale, MK-4482 / EIDD-2801 (rif.^{4,5}), che è stato riproposto per l'uso contro la sindrome respiratoria acuta grave coronavi-

rus 2 (SARS-CoV-2) ed è attualmente in fase II / III clinica tri- di SARS-CoV-2 frequentemente asintomatica o lievemente sintomatica als (NCT04405570 e NCT04405739). Qui, abbiamo esplorato l'efficacia di MK-4482 / EIDD-2801 per contrastare l'infezione da SARS-CoV-2 e bloccare la trasmissione. missione nel modello furetto, dato che furetti e affini i membri del genere donnola trasmettono il virus in modo efficiente con segni clinici minimi⁶⁻⁹, che assomiglia alla diffusione nella popolazione umana giovane-adulta. Dimostriamo un alto carico di SARS-CoV-2 nei tessuti nasali e nelle secrezioni, che coincideva con una trasmissione efficiente tramite contatto diretto. ogni giorno per un periodo di 10 giorni. Il virus si carica in alto e in basso Il trattamento terapeutico degli animali infetti con MK-4482 / EIDD-2801 due volte al giorno ha ridotto significativamente il SARS-CoV-2 carico nel tratto respiratorio superiore e diffusione completamente soppressa ad animali da contatto con trattati. Questo studio ha identificato quale dosaggio e tempo era rilevabile entro il settimo giorno negli animali MK-4482 / EIDD-2801 come promettente contraccollo antivirale sicuro di rompere le catene di trasmissione della comunità SARS-CoV-2.

MK-4482 / EIDD-2801 è il pro-farmaco disponibile per via orale dell'analogo nucleosidico *N*-idrossicitidina (NHC), che ha mostrato una potente attività del virus anti-influenzale in topi, cavie, furetti e organoidi dell'epitelio delle vie aeree umane^{4,10,11}. Agire attraverso l'induzione della catastrofe dell'errore nella replicazione del virus^{4,12}. NHC ha un'attività virale anti-RNA ad ampio spettro. Oltre a migliorare la malattia acuta, abbiamo dimostrato in un modello di trasmissione di cavie che l'NHC blocca efficacemente la diffusione del virus dell'influenza da animali infetti ad animali da contatto non trattati¹¹.

Sono stati sviluppati diversi modelli murini di infezione da coronavirus 2 (SARS-CoV-2) da sindrome respiratoria acuta grave, alcuni dei quali sono stati utilizzati anche per confermare l'efficacia in vivo di MK-4482 / EIDD-2801 contro i betacoronavirus¹³. Tuttavia, il SARS-CoV-2 umano non può infettare in modo produttivo i topi senza adattamento virale o introduzione di ACE2 umano in animali transgenici e nessuno dei modelli murini supporta la trasmissione a

successiva trasmissione da visone a visone su larga scala e, in alcuni casi diffusione virale tra i membri del genere donnola senza precedente adattamento⁶⁻⁹. Sebbene gli allevamenti di visoni riportassero un'elevata mortalità animale e segni clinici gastrointestinali e respiratori¹⁴, il follow-up dell'epidemia ha rivelato una continua diffusione all'interno della colonia per lunghi periodi di tempo⁸, suggerendo che i segni clinici acuti nella maggior parte degli animali infetti possono essere lievi. Questi rapporti sul campo del visone confermano i risultati ottenuti con furetti infettati sperimentalmente che mostrano che i mustelidi del genere donnola trasmettono la SARS-CoV-2 in modo efficiente senza una forte manifestazione clinica della malattia^{16,17}. Poiché questa presentazione dell'infezione da SARS-CoV-2 ricorda l'esperienza

diffuso nella popolazione umana giovane-adulta¹⁸, i furetti rappresentano una specie modello rilevante per valutare l'impatto terapeutico su SARS-CoV-2

Per convalidare prima l'invasione dell'ospite e il tropismo tissutale di SARS-CoV-2 nei furetti, abbiamo inoculato gli animali per via intranasale con 1×10^4 o 1×10^5 unità di formazione della placca (pfu) —gruppo con inoculo basso e alto, rispettivamente — dell'isolato clinico SARS-CoV-2 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020 per animale. Il carico del virus del capannone è stato monitorato

Il tratto respiratorio è stato determinato per due animali di ciascun gruppo di inoculi rispettivamente nei giorni quattro e dieci dopo l'infezione.

Questo studio ha identificato quale dosaggio e tempo era rilevabile del gruppo ad alto inoculo (Fig. 1a e tabella supplementare 1). L'infezione degli animali nel gruppo a basso inoculo era meno efficiente. I profili di spargimento erano strettamente correlati con il carico di particelle infettive nei turbinati nasali; un pesante carico di tessuto virale nel gruppo ad alto inoculo era presente il quarto giorno, che è diminuito sostanzialmente di circa quattro ordini di grandezza entro il giorno dieci (Fig. 1b e tabella supplementare 2).

L'infezione con una bassa concentrazione di inoculo ha determinato bassi carichi di virus nei turbinati il giorno 4 e un carico non rilevabile in seguito. Tuttavia, la quantificazione del numero di copie di RNA virale nei turbinati utilizzando RT-qPCR ha rivelato la presenza continua di moderata (circa 10^4 copie / tessuto) ad alto ($\geq 10^7$ copie / tessuto) carichi virali nei gruppi con inoculi bassi e alti, rispettivamente (Fig. 1c e tabella supplementare 3). Indipendentemente dalla concentrazione dell'inoculo, non sono state rilevate particelle infettive nei lavaggi broncoalveolari o nei campioni di tessuto polmonare (Extended Data Fig. 1). Anche diversi campioni di organi (polmoni, cuore, reni e fegato) erano RT-qPCR-negativi in entrambi i giorni 4 e 10 (Fig. 1d), confermando

¹ Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, Atlanta, GA, USA. ² Questi autori hanno contribuito allo stesso modo: Robert M. Cox, Josef D. Wolf.

✉ e-mail: rplemper@gsu.edu

infezione inefficiente del tratto respiratorio inferiore del furetto e limitata invasione sistemica dell'ospite. Solo i campioni di intestino tenue e crasso erano positivi alla PCR il giorno 4 dopo l'infezione e i tamponi rettali hanno mostrato una continua eliminazione di basso grado di materiale genetico virale (Fig. 1e e tabella supplementare 4).

Gli animali del gruppo ad alto inoculo hanno sperimentato un calo transitorio del peso corporeo che ha raggiunto un plateau basso nei giorni 5-6 dopo l'infezione, ma si è ripreso completamente alla fine dello studio (Fig. 1f e Tabella Supplementare 5). Un animale nel gruppo a basso inoculo ha mostrato una graduale leggera riduzione del peso corporeo fino alla fine dello studio (giorno 10). Non sono stati osservati altri segni clinici, come febbre o secrezione respiratoria. La conta ematica completa (CBC) eseguita ogni due giorni non ha rivelato alcun deterioramento significativo rispetto all'intervallo normale nella conta globale dei globuli bianchi, nonché nelle popolazioni di linfociti, neutrofili e piastrine di entrambi i gruppi di inoculo (Fig. 1g e tabella supplementare 6). I livelli di espressione relativa dell'interferone di tipo I e II nelle cellule mononucleate del sangue periferico del furetto (PBMC) campionate a intervalli di 48 ore hanno raggiunto un plateau circa 3d dopo l'infezione e sono rimasti moderatamente elevati fino alla fine dello studio (Fig. 1h, io e tabella supplementare 7). I livelli di IL-6 erano moderatamente elevati in alcuni animali ma questi cambiamenti non hanno raggiunto la significatività statistica (Fig. 1j). Tuttavia, abbiamo notato un picco di espressione prominente di geni stimolati con interferone (ISG) selezionati con funzione effettrice antivirale (MX1 e ISG15) 4d dopo l'infezione, seguito da un ritorno all'espressione basale entro la fine dello studio (Fig. 1k, l).

Prima della valutazione dell'efficacia in vivo, abbiamo convalidato la potenza dell'NHC contro l'isolato clinico SARS-CoV-2 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020 in coltura cellulare (Fig. 2a). I modelli di regressione a pendenza variabile a quattro parametri dei dati dose-risposta hanno rivelato 50 e 90% di concentrazioni effettive (EC_{50} e CE_{90} , rispettivamente) di circa $3,4 \mu M$ e $5,4 \mu M$, rispettivamente, che è all'interno un intervallo di circa sei volte i dati sulla potenza riportati per altri betacoronavirus umani¹⁹. Sulla base di questi risultati, i furetti sono stati infettati con 1×10^5 pfu per animale nei successivi test di efficacia MK-4482 / EIDD-2801 ei livelli di virioni infettivi nei lavaggi nasali sono stati determinati due volte al giorno (Fig. 2b). Il carico virale nei tessuti respiratori è stato valutato 4d dopo l'infezione. In tutti gli esperimenti di trattamento, MK-4482 / EIDD-2801 è stato somministrato due volte al giorno (bid) tramite sonda gastrica. Il dosaggio è iniziato 12 ore dopo l'infezione a 5 o 15 mg / kg⁻¹ peso corporeo o 36 ore dopo l'infezione a 15 mg / kg⁻¹.

I titoli di virus diffuso nei lavaggi nasali erano equivalenti in tutti i gruppi MK-4482 / EIDD-2801 e nei controlli trattati con veicolo al momento del primo trattamento (12 ore dopo l'infezione), indicando un'inoculazione uniforme di tutti gli animali nello studio (Fig. 2c e dati estesi Fig. 2a). L'inizio della terapia al punto di 12 ore ha portato a una riduzione significativa ($P < 0,001$) della carica virale diffusa entro 12 ore, indipendentemente dalla dose di MK-4482 / EIDD-2801 somministrata, e

le particelle infettive sono diventate non rilevabili entro 24 ore dall'inizio del trattamento. Quando somministrato per la prima volta al picco della diffusione del virus (36 ore dopo l'infezione), MK-4482 / EIDD-2801 ha completamente soppresso il rilascio di virioni infettivi nei lavaggi nasali entro un periodo leggermente più lungo di 36 ore, mentre gli animali di controllo del veicolo hanno continuato a liberarsi particelle infettive fino alla fine dello studio.

Solo gli animali trattati con veicolo presentavano un carico di virus rilevabile nei loro turbinati nasali 3.5d dopo l'infezione (Fig. 2d e Extended Data Fig. 2b), indicando che MK-4482 / EIDD-2801 aveva messo a tacere tutta la replicazione di SARS-CoV-2. L'RNA di SARS-CoV-2 era ancora rilevabile nei tessuti nasali estratti da animali in tutti i gruppi, sebbene significativamente ridotto ($P = 0,0089$ e $0,0081$ per 5 e 15 mg / kg⁻¹).

MK-4482 / EIDD-2801, rispettivamente) negli animali trattati rispetto ai controlli del veicolo (Fig. 2e e dati estesi Fig. 2c). Gli animali nei gruppi terapeutici di 12 ore hanno mostrato una significativa riduzione ($P \leq 0,044$) nell'espressione dell'ISG effettrici rispetto agli animali trattati con veicolo, sebbene non siano state osservate differenze significative nell'interferone relativo e nell'induzione di IL-6 (Extended Data Fig. 3a – f).

Questi risultati dimostrano l'efficacia orale della somministrazione terapeutica di MK-4482 / EIDD-2801 contro l'infezione acuta da SARS-CoV-2 nel modello del furetto. Coerentemente con il nostro precedente work-up farmacocinetico e tossicologico di MK-4482 / EIDD-2801 nei furetti, il trattamento non ha causato effetti avversi fenotipicamente evidenti e la conta dei globuli bianchi e delle piastrine degli animali trattati con farmaci è rimasta entro il range normale (Extended Data Fig. 4).

La diffusione del SARS-CoV-2 nel tratto respiratorio superiore dei furetti stabilisce le condizioni per la diffusione produttiva dalla fonte infetta agli animali da contatto non infetti^{16, 17}. Per valutare l'efficienza di trasmissione, abbiamo ospitato animali sorgente infettati per via intranasale con due animali da contatto non infetti ciascuno per un periodo di 3d, a partire da 30 ore dopo l'inoculazione dell'animale sorgente (Fig. 3a). Lavaggi nasali e tamponi rettali sono stati ottenuti giornalmente da tutti gli animali e il sangue è stato prelevato all'inizio dello studio e nei giorni quattro e otto dopo l'infezione originale. Il carico virale e il numero di copie di RNA nei tessuti respiratori sono stati determinati alla fine della fase di co-housing (animali di origine) e al termine dello studio (animali da contatto).

Le particelle infettive sono emerse per la prima volta nei lavaggi nasali di alcuni animali da contatto 24 ore dopo l'inizio del co-housing (Fig. 3b e tabella supplementare 8). Alla fine della fase di co-stabulazione, tutti gli animali a contatto sono stati infettati e si sono avvicinati alla fase di replicazione del virus di punta, dimostrando che la trasmissione di SARS-CoV-2 tra i fereti è rapida ed altamente efficiente.

Una seconda coorte di animali sorgente inoculati in parallelo con SARS-CoV-2 ha ricevuto MK-4482 / EIDD-2801 per via orale alla dose di 5 mg / kg⁻¹ peso corporeo, somministrato bid a partire da 12 ore dopo

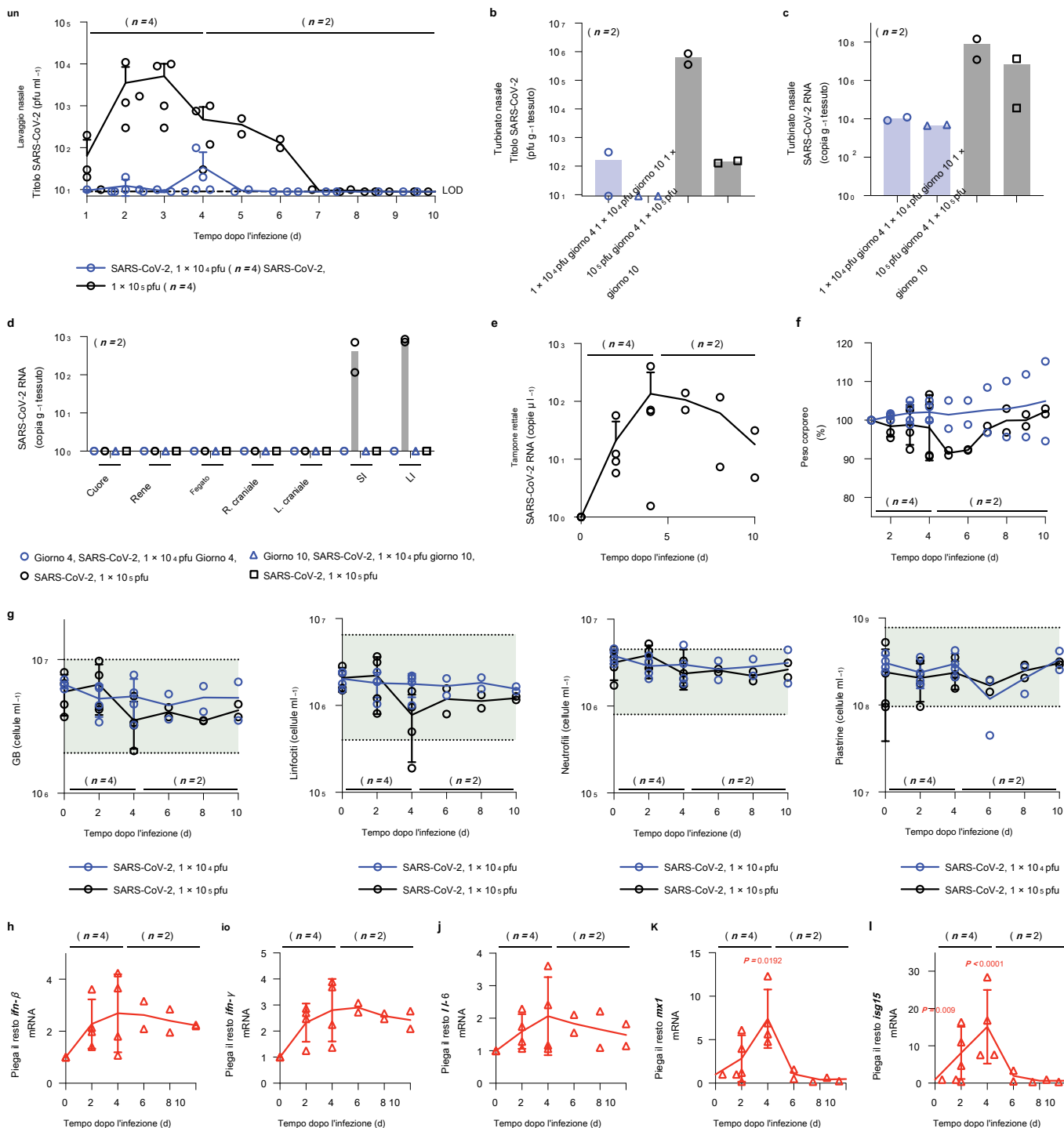
Fig. 1 | SARS-CoV-2 infetta il tratto respiratorio superiore dei furetti. Furetti ($n = 4$ animali biologicamente indipendenti) sono stati inoculati per via nasale con uno dei due $\times 10^5$ o 1×10^6 pfu 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020. **a**, Titolo del virus nei lavaggi nasali raccolti giornalmente. LOD, limite di rilevamento. **b – f**, A 4 e 10 giorni dall'infezione, due furetti di ciascun gruppo sono stati uccisi e l'infezione è stata caratterizzata. **b**, Numero di particelle di virus infettive nei turbinati nasali. **c**, L'RNA virale era presente nei turbinati nasali di tutti i furetti infetti. **d**, Numero di copie di RNA virale, determinato mediante PCR quantitativa con trascrizione inversa (RT – qPCR), in organi selezionati estratti da furetti infetti 4 o 10 giorni dopo l'infezione. Due lobi polmonari (destro (R.) e sinistro (L.) craniale) per animale; SI, intestino tenue; LI, intestino crasso. **e**, Rilevazione dell'RNA 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020 in tamponi rettali di furetti inoculati con 1×10^5 pfu RNA è stato estratto dai tamponi rettali e il numero di copie assolute è stato determinato utilizzando RT-qPCR. **f**, Peso corporeo dei furetti, misurato quotidianamente ed espresso come percentuale del loro peso al giorno 0. **g**, Analisi CBC, eseguita ogni due giorni. Non sono state rilevate differenze evidenti per nessuno dei parametri testati, inclusi globuli bianchi totali (WBC), linfociti, neutrofili e piastrine. Le aree verdi ombreggiate rappresentano l'intervallo dei normali valori di laboratorio di Vetscan HM5. **h – l**, Selezione le risposte dell'interferone e delle citochine nelle PBMC raccolte ogni due giorni dopo l'infezione. Analisi mediante RT – qPCR relativa al giorno 0 per gli animali infettati con 1×10^5 pfu 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020. **Ciao**, I furetti infetti hanno mostrato un'elevata espressione di

ifn- β (**h**) e *ifn- γ* (**io**). **j**, Solo alcuni animali avevano livelli moderatamente elevati di *il-6*. **k, l**, I geni stimolati dall'interferone *mx1* (**k**; $P = 0,0192$ il giorno 4) e *isg15* (**l**; $P = 0,009$ e $P < 0,0001$ rispettivamente nei giorni 2 e 4) ha mostrato un picco netto il giorno 4 dopo l'infezione. Il numero di ripetizioni biologiche indipendenti (n , singoli animali) è mostrato per ogni sottopannello. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un'analisi della varianza a due vie (ANOVA) con il test di confronto multiplo post-hoc di Dunnett. I simboli rappresentano ripetizioni biologiche indipendenti (singoli animali), le linee collegano la media del gruppo $\pm$ sd (**a**, **e** - **l**) e i grafici a barre mostrano la media (**b** - **d**).

infezione. L'infezione produttiva di questi animali è stata convalidata dai titoli di SARS-CoV-2 nei lavaggi nasali 1d dopo l'infezione (Fig. 3b), che corrispondevano molto da vicino a quelli visti nei test iniziali di efficacia (Fig. 2c). Sebbene abbiamo anche ospitato gli animali sorgente trattati con due contatti non trattati ciascuno per quasi 3d, nessuna particella infettiva di SARS-CoV-2 è stata rilevata in nessuna delle serie di lavaggi nasali ottenuti da questi contatti durante lo studio o in nessuno dei nasali turbinati campionati dall'animale di contatto alla fine dello studio (Fig. 3c e tabella supplementare 9).

I turbinati nasali estratti dai contatti degli animali di origine trattati con il veicolo contenevano un numero elevato di copie di RNA virale, sottolineando il successo dell'invasione dell'ospite dopo la trasmissione

(Figura. 3d e Tabella Supplementare 10). Coerentemente con le nostre precedenti osservazioni, i turbinati degli animali sorgente trattati ospitavano da moderato ad alto ($\geq 10^5$ copie · tessuto) livelli di RNA virale, sebbene non sia stato possibile rilevare particelle infettive. Al contrario, tutti i tessuti respiratori dei contatti co-alloggiati con gli animali di origine trattati con MK-4482 / EIDD-2801 sono rimasti liberi da genoma SARS-CoV-2, indicando l'assenza di qualsiasi replicazione virale di basso grado che potrebbe aver ipoteticamente progredito in questi animali al di sotto del livello di rilevamento di particelle infettive (Fig. 3e, f e Tabelle Supplementari 11,12). Inoltre, l'RNA di SARS-CoV-2 era presente con un basso numero di copie nei campioni di tessuto intestinale e nei tamponi rettali degli animali sorgente del veicolo, nonché nei loro contatti, ma non rilevabile



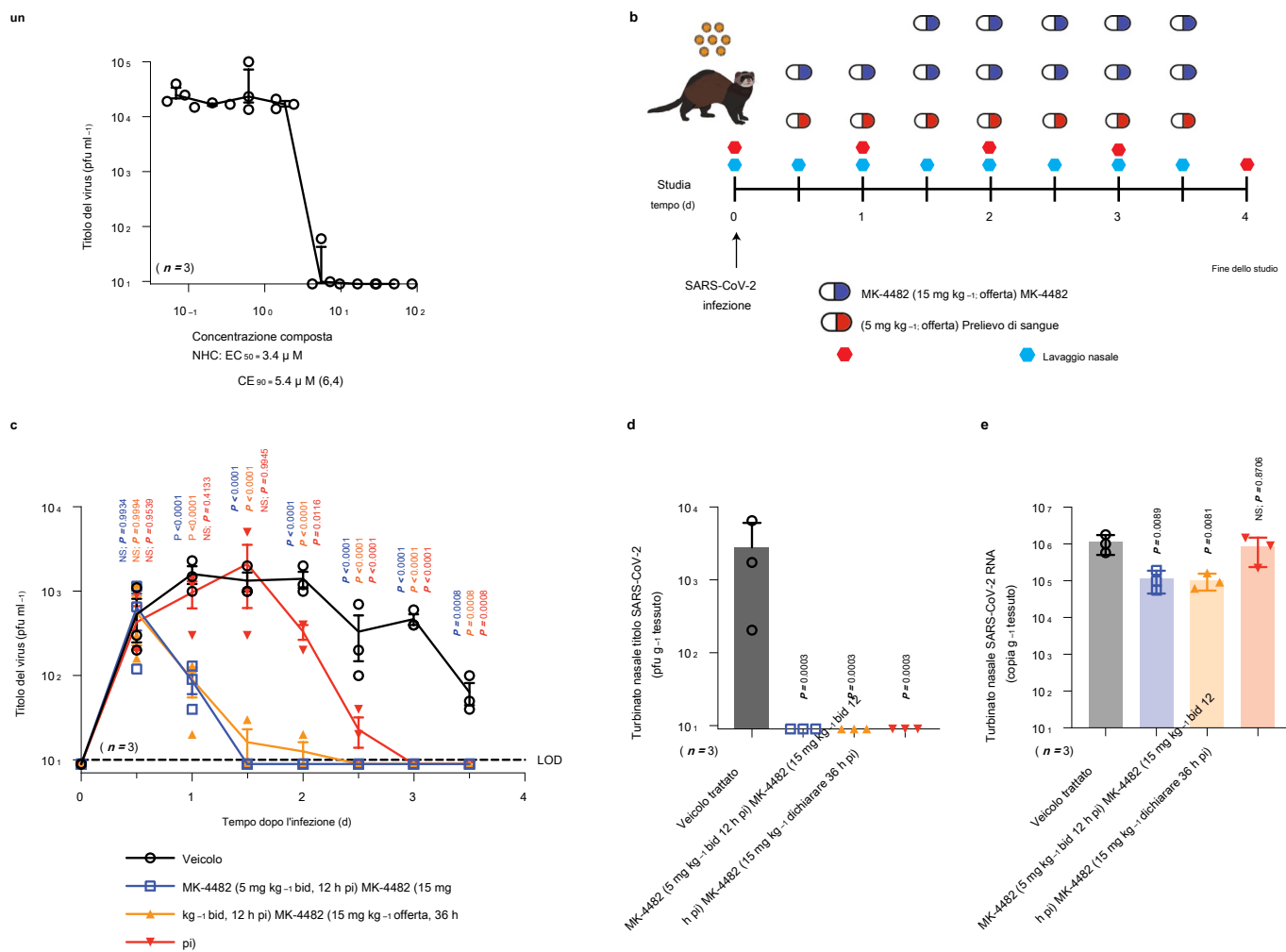


Fig. 2 | MK-4482 / EIDD-2801 terapeutico è efficace per via orale contro SARS-CoV-2 nei furetti. **a**, Test di inibizione dose-risposta di NHC contro SARS-CoV-2 in cellule Vero E6 (molteplicità di infezione di 0,1 pfu per cellula; $n = 3$ esperimenti biologicamente indipendenti). Le concentrazioni efficaci (EC₅₀ e CE₉₀ mostrato con il limite superiore dell'intervallo di confidenza del 95% tra parentesi) sono stati derivati da modelli di regressione a pendenza variabile a quattro parametri. **b**, Schema dello studio di efficacia terapeutica. Furetti ($n = 3$ animali biologicamente indipendenti) sono stati infettati per via nasale con 1×10^4 pfu 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020 e gavaged con veicolo o offerta trattata con MK-4482 / EIDD-2801 a partire da 12 (5mgkg⁻¹ e 15mgkg⁻¹) o 36 ore (15mgkg⁻¹) dopo l'infezione. I lavaggi nasali sono stati raccolti due volte al giorno e il sangue è stato raccolto a giorni alterni. I cerchi gialli rappresentano animali originari infetti da SARS-CoV-2 e SARS-CoV2. **c**, Titoli virali dei lavaggi nasali dei furetti infetti da **b**. Il trattamento con MK-4482 / EIDD-2801 ha ridotto significativamente i titoli del virus entro 12 ore dall'inizio della somministrazione in tutti i gruppi di trattamento. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un'ANOVA a due vie con il test post-hoc di confronto multiplo di Dunnett. **d**, **e**, Particella infettiva (**d**) e copia di RNA virale (**e**) numeri nei turbinati nasali dei furetti infetti estratti 4d dopo l'infezione. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un'ANOVA unidirezionale con il test post-hoc di confronto multiplo di Dunnett. **c** - **e**, P vengono visualizzati i valori; NS, non significativo; pi, post infezione. Il numero di ripetizioni biologiche indipendenti è mostrato per ogni pannello. I simboli rappresentano ripetizioni biologiche indipendenti (singoli animali), le linee collegano la media del gruppo $\pm$ sd (**corrente alternata**) e i grafici a barre mostrano la media $\pm$ sd (**d**, **e**).

nel gruppo sorgente trattato con MK-4482 / EIDD-2801 e animali da contatto co-alloggiati.

L'analisi filogenetica dei focolai negli allevamenti di visoni ha rivelato una circolazione intra-colonia prolungata e una trasmissione zoonotica del visone all'uomo⁸, portando a selezionare i furetti - membri del genere wea- sel strettamente imparentati con i visoni - come modello di trasmissione SARS-CoV-2. Abbiamo notato che l'infezione sperimentale dei furetti era fortemente dipendente dalla quantità di inoculo virale utilizzato. L'invasione produttiva dell'ospite è stata osservata solo dopo la consegna intranasale di 1×10^5 pfu SARS-CoV-2. La carica shed SARS-CoV-2 nei lavaggi nasali dei furetti, un marker virologico fondamentale di un modello di trasmissione, ha mostrato una buona coerenza tra gli studi. I nostri esperimenti hanno restituito titoli virali di picco di 1×10^5 - 1×10^4 pfu ml⁻¹.

molto simile ai titoli di lavaggio del furetto trovati in due studi precedenti, che riportavano fino a 1×10^4 pfu ml⁻¹ (rif. 20) e

1×10^5 Dosaggio infettivo per coltura tissutale mediana eml⁻¹ (rif. 21) rispettivamente nei lavaggi nasali.

L'infezione naturale attraverso il contatto diretto è risultata altamente efficiente, riflettendo probabilmente l'esposizione prolungata del contatto agli animali di origine in uno spazio ristretto. Tuttavia, quasi tutti i contatti hanno iniziato a diffondere il virus entro meno di 24 ore dall'inizio del co-housing. Questa linea temporale indica che la trasmissione deve essersi verificata poco dopo l'introduzione del contatto con gli animali sorgente, nonostante il fatto che i titoli virali di capannone degli animali sorgente fossero solo 1×10^3 pfu ml⁻¹.

lavaggio nasale in questo periodo di malattia. La trasmissione di SARS-CoV-2 tra i furetti attraverso l'aria è stata recentemente dimostrata²².

I nostri risultati sottolineano che l'infezione naturale con SARS-CoV-2 attraverso goccioline di grandi dimensioni, aerosol e / o fomite è altamente produttiva.

MK-4482 / EIDD-2801 è attualmente in fase di test in avanzati studi clinici multicentrici, che sono stati lanciati dopo il successo

completamento delle prove di sicurezza di fase I (ovvero, [NCT04392219](#)). Sebbene i dosaggi applicati in questi studi e i dati di farmacocinetica umana non siano stati ancora divulgati, Merck & Co. hanno rivelato [23](#) che NHC ha raggiunto livelli nel sangue umano che erano sicuri e hanno superato le concentrazioni antivirali contro SARS-CoV-2 nell'uomo primario

culture di epitelio delle vie aeree (NHC EC₅₀ di circa 0,5–1 μ M; rif. [13](#)). I nostri profili farmacocinetici per MK-4482 / EIDD-2801

ha rivelato che le concentrazioni plasmatiche di NHC $\geq$ 0,5 μ M a valle (12 ore dopo la somministrazione basata su un regime bid) vengono raggiunti dopo dosi orali di circa 130 e 10 mg / kg⁻¹ sono stati somministrati a cynomolgus

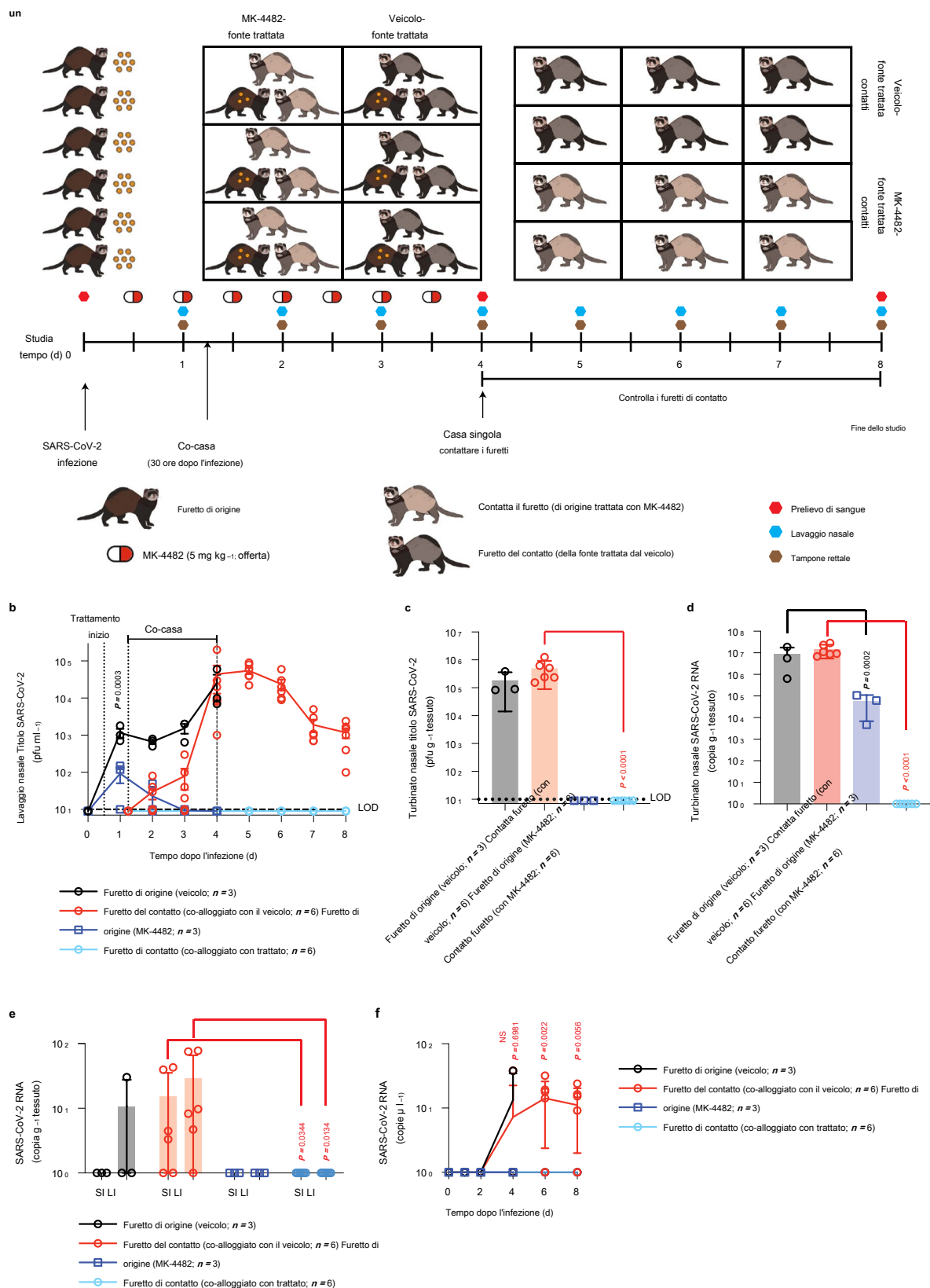


Fig. 3 | Il trattamento orale terapeutico con MK-4482 / EIDD-2801 previene la trasmissione per contatto. **a**, Schema dello studio sulla trasmissione dei contatti. Due gruppi di furetti di origine ($n = 3$ animali biologicamente indipendenti ciascuno) sono stati infettati con 1×10^5 pfu 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020 e ha ricevuto il trattamento MK-4482 / EIDD-2801 (5mg/kg - offerta) o veicolo che parte 12 ore dopo l'infezione. A 30 ore dall'infezione, ogni furetto originario è stato ospitato insieme a due furetti da contatto non infetti non trattati. Gli animali di origine sono stati eutanasiati dopo 3d, e i furetti di contatto sono stati isolati e monitorati per 4d. Una volta al giorno sono stati raccolti lavaggi nasali e tamponi rettali e il sangue è stato prelevato a 0, 4 e 8 giorni dall'infezione. **b**, I furetti di origine trattati con MK-4482 / EIDD-2801 avevano titoli di virus significativamente inferiori rispetto agli animali del veicolo 12 ore dopo l'inizio del trattamento ($P = 0.0003$). I contatti delle fonti trattate dai veicoli hanno iniziato a perdere 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020 entro 20 ore dal co-housing. Nessun virus è stato rilevato nei contatti non trattati dei furetti di origine trattati con MK-4482 / EIDD-2801. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un'ANOVA a due vie con il test post-hoc di confronto multiplo di Sidak; P vengono visualizzati i valori. **CD**, Particella infettiva (**c**) e copia di RNA virale (**d**) numeri nei turbinati nasali della sorgente e furetti di contatto da **b** estratti rispettivamente 4 e 8d dopo l'inizio dello studio. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un'ANOVA unidirezionale con il test post-hoc di confronto multiplo di Sidak (c , $P < 0.0001$ per il confronto intergruppo di animali da contatto; **d**, $P = 0.0002$ e $P < 0.0001$ per confronti intergruppo degli animali di origine e contratto, rispettivamente). **e**, **f**, Numero di copie dell'RNA virale nell'intestino tenue (SI) e crasso (LI) (**e**), e tamponi rettali (**f**). I campioni dei furetti di origine trattati con MK-4482 / EIDD-2801 e i loro contatti erano negativi alla PCR per l'RNA virale. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un metodo unidirezionale (**e**) o bidirezionale (**f**) ANOVA con il test post-hoc di confronto multiplo di Sidak. I campioni confrontati nei test post-hoc (**c** - **f**) sono stati contrassegnati da un codice colore nero o rosso rispettivamente per la fonte trattata con il veicolo e per i furetti di contatto. Il numero di ripetizioni biologiche indipendenti è mostrato per ogni pannello. P vengono visualizzati i valori. I simboli rappresentano ripetizioni biologiche indipendenti (singoli animali), le linee collegano la media del gruppo $\pm$ sd (**b**, **f**) e i grafici a barre mostrano la media $\pm$ sd (**c** - **e**).

rispettivamente macachi e furetti⁴. Questi calcoli hanno guidato la nostra decisione di dosare i furetti con 5mg/kg⁻¹ dose utilizzata in questo studio, che rappresenta una stima conservativa di una dose equivalente umana sicura basata su tutte le informazioni disponibili. Sottolineando l'elevato potenziale antivirale ad ampio spettro del farmaco, 5 mg / kg⁻¹

è anche vicino alla dose efficace più bassa di MK-4482 / EIDD-2801 contro i virus influenzali stagionali e pandemici nei furetti^{4, 10}.

Molto simile alla nostra precedente esperienza con la terapia antinfluenzale^{4, 10}, MK-4482 / EIDD-2801 è stato ben tollerato ed efficace per via orale contro SARS-CoV-2, riducendo il carico virale delle vie respiratorie superiori al di sotto del livello di rilevamento entro 24 ore dalla prima somministrazione del farmaco quando la terapia è stata iniziata dopo l'inizio della eliminazione del virus e di quasi due ordini di grandezza quando somministrato per la prima volta al culmine della replicazione del virus. Allo stesso modo, il materiale genetico virale non era rilevabile nei campioni gastrointestinali degli animali trattati, il che è coerente con le precedenti osservazioni di una presenza sostenuta della forma biologicamente attiva di NHC trifosfato in tutti i tessuti molli, eccetto il fegato, in diverse specie.^{4, 12, 24}

È importante sottolineare che il trattamento ha soppresso tutta la trasmissione ai contatti diretti non trattati nonostante una prolungata vicinanza diretta della sorgente e degli animali da contatto, nonché la diffusione rilevabile del virus dagli animali sorgente all'inizio della fase di co-housing. Questo blocco completo può indicare una soglia inferiore del carico SARS-CoV-2 del capannone per una diffusione corretta. Inoltre, l'integrità del genoma di alcuni virioni con EIDD-2801 emessi dagli animali trattati potrebbe essere stata solo parzialmente compromessa. Piuttosto che terminare la catena quando incorporato dalla polimerasi virale, l'NHC subisce interconversioni tautomeriche spontanee, portando all'accoppiamento di basi come citosina o uracile²⁵. Le mutazioni di transizione risultanti posizionate casualmente inducono una catastrofe da errore virale²⁶, causando un collasso della popolazione di virus. Questo meccanismo di attività antivirale di NHC è stato dimostrato per gli alfavirus¹².

pneumovirus¹¹ e ortomixovirus⁴, e ha confermato di applicarsi ugualmente ai betacoronavirus¹⁹ e in particolare SARS-CoV¹³. Nel nostro studio, una presenza limitata dell'analogo nei genomi virali generati subito dopo l'inizio del trattamento può aver avuto un impatto maggiore sull'invasione naturale di un ospite immunocompetente in vivo che sulla replicazione del virus in interferone di tipo I carente. cellule in coltura come il Vero E6 utilizzato per la titolazione. Questa visione è coerente con la frequente osservazione (come nel rif. 28) che molti virus mutanti possono essere propagati in colture cellulari ma sono attenuati in vivo e incapaci di invasione produttiva dell'ospite.

Coerentemente con il meccanismo d'azione antivirale conservato di NHC su diversi target virali, diversi tentativi precedenti di indurre una robusta resistenza al composto negli alfavirus¹², orto-mixovirus⁴ e betacoronavirus non hanno avuto successo, indicando un'elevata barriera genetica contro la fuga virale. Per i betacoronavirus

in particolare, dopo 30 passaggi in presenza di o, è stato riportato un aumento molto moderato di due volte della concentrazione di CE₅₀ inibitore¹⁹.

Dato che queste mutazioni hanno ritardato la replicazione virale e quindi rappresentato una penalis di idoneità, è improbabile che l'uso clinico di MK-4482 / EIDD-2801 provochi l'emergere di una resistenza preesistente nelle popolazioni di virus circolanti o inneschi la comparsa di virus virali. varianti con maggiore patogenicità.

I nostri precedenti studi con virus influenzali nei furetti⁴ e porcellini d'India¹¹ dimostrano inoltre che l'efficacia antivirale e il blocco della trasmissione di MK-4482 / EIDD-2801 non sono limitati alla specie ospite. Uno studio virologico su pazienti ospedalizzati con malattia da coro-navirus 2019 (COVID-19) ha rivelato che il carico medio di copie di RNA SARS-CoV-2 rilevate nell'espettorato umano durante la fase di picco dell'infezione è $7,0 \times 10^6$ copieml⁻¹ (massimo di

2.35×10^9 copieml⁻¹)²⁹. I tentativi di isolamento del virus da pazienti umani generalmente non hanno avuto successo quando i campioni contenevano

$< 1 \times 10^6$ Copie di RNA ml⁻¹. Nei furetti, abbiamo trovato titoli di spargimento di picco di $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ pfuml⁻¹ nei lavaggi nasali e in uno studio precedente hanno riportato che concentrazioni di SARS-CoV-2 fino a 1×10^4 pfuml⁻¹

il lavaggio nasale del furetto è correlato fino a 1×10^6 copie di RNA virale ml⁻¹

(rif. 20). Questi confronti suggeriscono che il picco di carico di copie virali di RNA nei lavaggi nasali dei furetti ricapitola quello osservato nell'espettorato umano. Al momento, la distribuzione nei tessuti e l'efficacia antivirale di MK-4482 / EIDD-2801 nell'uomo sono ancora sconosciute. Tuttavia, se i dati di inibizione della trasmissione della SARS-CoV-2 basati su furetti sono predittivi dell'effetto nell'uomo, i pazienti con COVID-19 potrebbero diventare non infettivi entro 24-36 ore dall'inizio del trattamento orale. Il trattamento con MK-4482 / EIDD-2801, in particolare se avviato precocemente dopo l'infezione, ha quindi il potenziale per fornire triplici benefici: può mitigare il rischio di progressione verso una malattia grave e accelerare il recupero, alleviare l'emotività e il socio-economico pedaggio associato all'isolamento prolungato obbligatorio e aiuto nel silenziare rapidamente i focolai locali.

Metodi

Progettazione dello studio. Furetti (*Mustela putorius furo*) sono stati utilizzati come modello in vivo per esaminare l'efficacia di MK-4482 / EIDD-2801 somministrato per via orale contro l'infezione da SARS-CoV-2 e la trasmissione del virus ad animali da contatto non infetti. I virus sono stati somministrati agli animali di origine tramite inoculazione intranasale e la carica virale nei lavaggi nasali e nei tamponi rettali è stata monitorata periodicamente, nonché nei tessuti respiratori e in un sottogruppo di organi 4 o 10 giorni dopo l'esposizione. I titoli del virus sono stati determinati sulla base dei test della placca e dei numeri di copie dell'RNA virale; campioni di sangue sono stati sottoposti ad analisi CBC e quantificazione RT-qPCR dei livelli di espressione di citochine selezionate e effettori antivirali innati.

Cellule e virus. Le cellule Vero E6 sono state ottenute dalla American Type Culture Collection (ATCC CRLK-1586) e coltivate in DMEMmedium supplementato con 7,5% di siero bovino fetale inattivato al calore (FBS) a 37 ° C con 5% di CO₂. SARS-CoV-2 (2019-nCoV / USA-WA1 / 2020) è stato propagato utilizzando cellule Vero E6

integrato con il 2% di FBS. Le scorte di virus erano archiviate in - 80 ° C e titoli sono stati determinati mediante dosaggio della placca. Le cellule Vero E6 sono state autentiche in base alla morfologia e alla suscettibilità all'infezione da virus e controllate di routine per la contaminazione batterica e da micoplasma a intervalli di 6 mesi.

Test di riduzione della resa del virus. Le cellule Vero E6 sono state seminate in piastre da 12 pozzetti (3 × 10⁵ cellule per pozzetto) 24 ore prima dell'infezione. Le cellule sono state infettate utilizzando una molteplicità di infezioni di 0,1 pfu per cellula. SARS-CoV-2 è stato lasciato adsorbire per 1 ora a 37 ° C. Successivamente, l'inoculo del virus è stato rimosso e le cellule sono state ricoperte con un terreno contenente tre diluizioni seriali di NHC (50-0,68 µ M) in DMEM integrato con il 2% di FBS. Le cellule infette sono state incubate con

composto per 48 ore a 37 ° C, seguito dalla titolazione del virus mediante dosaggio della placca. La CE₅₀ e CE₁₀₀ le concentrazioni sono state calcolate utilizzando un modello di regressione a pendenza variabile a quattro parametri.

Test della placca. I campioni sono stati diluiti in serie (diluizioni decuplicate a partire da una diluizione iniziale 1:10) in DMEMmedium integrato con FBS al 2% contenente antibiotico-antimicotico (Gibco). Le diluizioni seriali sono state aggiunte alle cellule Vero E6 seminate in piastre da 12 pozzetti a 3 × 10⁵ cellule per pozzetto nelle 24 ore precedenti. Il virus è stato lasciato adsorbire per 1 ora a 37 ° C. Successivamente, l'inoculo è stato rimosso e le cellule sono state ricoperte con 1.2% di Avicel (FMC BioPolymer) in DMEM e

incubato per 3d a 37 ° C con 5% di CO₂. L'Avicel è stato rimosso e le cellule sono state lavate una volta con PBS, fissate con formalina tamponata neutra al 10% e le placche sono state visualizzate utilizzando l'1% di violetto di cristallo.

Determinazione della dose infettiva. Furetti femmine (6-10 mesi di età) sono stati acquistati da Triple F Farms. I furetti sono stati lasciati riposare per 1 settimana dopo l'arrivo, quindi assegnati in modo casuale a gruppi e alloggiati individualmente in gabbie ventilate a pressione negativa in una struttura ABSL-3. Per stabilire un inoculo adatto per gli studi di efficacia e trasmissione, i furetti ($n = 4$) sono stati inoculati per via nasale con $1 \times 10^{5.0}$ e $1 \times 10^{5.5}$ pfu 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020 in 1 ml (0,5 ml per nare). I furetti sono stati anestetizzati con dexmedetomidina / ketamina prima dell'inoculazione. I lavaggi nasali sono stati eseguiti su animali non anestetizzati una volta al giorno utilizzando 1 ml di PBS contenente un duplice concentrato di antibiotico-antimicotico (Gibco). I liquidi di lavaggio nasale sono stati conservati in - 80 ° C fino alla titolazione del virus mediante saggi di placca su cellule Vero E6. Per il prelievo di sangue, i furetti sono stati anestetizzati con dexmedetomidina e circa 0,5 ml di sangue sono stati prelevati dalla vena cava anteriore. Un Vetscan HM5 (Abaxis) è stato utilizzato per eseguire CBC in conformità con il protocollo del produttore. I tamponi rettali sono stati eseguiti ogni 2 giorni. Gruppi di due furetti sono stati uccisi 4 e 10 giorni dopo l'infezione e i loro organi sono stati prelevati per determinare i titoli del virus e la presenza di RNA virale in diversi tessuti.

Animali. Le dimensioni del gruppo erano tre furetti per condizione per tutti gli esperimenti sugli animali. Un calcolo della potenza ($P < 0,05$; 80% di potenza) ha previsto che questo campione la dimensione era sufficiente per rilevare una differenza di $1,19 \log_{10}$ pfu/ml. Il titolo del virus nei lavaggi nasali del furetto. Come set di dati di riferimento non statisticamente informativo per SARS-CoV-2 Il modello di furetto era disponibile all'inizio dello studio, abbiamo basato questo calcolo prospettico sulla nostra esperienza con un modello di infezione da furetto da virus del circolo canino che ha mostrato una deviazione standard cumulativa di 0,32 nel nostro laboratorio. Negli esperimenti di trasmissione, i furetti sono stati co-alloggiati in un rapporto di una sorgente per due animali da contatto, tre set di co-housing per condizione. Gli animali in arrivo sono stati assegnati in modo casuale ai diversi gruppi di studio; non è stato eseguito l'accamento degli investigatori.

Efficacia in vivo di MK-4482 / EIDD-2801 nei furetti. I gruppi di furetti sono stati inoculati con $1 \times 10^{5.5}$ pfu 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020 in 1 ml (0,5 ml per nare). A 12 ore dall'infezione, tre gruppi di furetti sono stati trattati bid con veicolo (1% metilcellulosa) o MK-4482 / EIDD-2801 alla dose di 5 o 15 mg / kg. , rispettivamente. A 36 ore dall'infezione, un quarto gruppo di furetti ha iniziato a ricevere un trattamento bid con MK-4482 / EIDD-2801 alla dose di 15 mg / kg. .

Il composto è stato somministrato tramite sonda gastrica in metilcellulosa all'1%. Dopo l'inizio del trattamento, la somministrazione bid è stata continuata fino a 4 giorni dopo l'infezione. I lavaggi nasali sono stati eseguiti su tutti i furetti ogni 12 ore. I campioni di sangue erano ottenuti ogni 2 g dopo l'infezione e conservato in K₂ Provette EDTA (Sarstedt CB 300). L'analisi CBC è stata eseguita su ogni campione di sangue secondo i protocolli del produttore. Dopo l'analisi CBC, i globuli rossi erano lisati con tampone ACK (150 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 e 0,01 mM EDTA pH7,4) e le PBMC sono state raccolte e conservate in - 80 ° C in RNA in seguito fino a è stata eseguita un'ulteriore analisi RT-qPCR. Tutti i furetti sono stati sottoposti a eutanasia 4 giorni dopo l'infezione e i loro organi sono stati prelevati per determinare i titoli virali e la presenza di RNA virale in diversi tessuti.

Trasmissione per contatto di SARS-CoV-2 nei furetti. Un gruppo di sei furetti di origine, che sono stati alloggiati individualmente, sono stati inoculati per via nasale con $1 \times 10^{5.5}$ pfu 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020. Dodici ore dopo l'infezione, i furetti di origine sono stati divisi in due gruppi ($n = 3$ ciascuno) veicolo ricevente o trattamento MK-4482 / EIDD-2801 alla dose di 5 mg / kg. offerta per sonda orale. A 30 ore dall'infezione, ogni furetto originario è stato ospitato insieme a due furetti da contatto non infetti e non trattati. I furetti sono stati ospitati insieme fino a 96 ore dopo l'infezione, quando erano i furetti di origine

eutanasia e gli animali da contatto sono stati alloggiati individualmente. Gli animali da contatto sono stati monitorati per 4 giorni dopo la separazione dai furetti di origine e quindi uccisi. Lavaggi nasali e tamponi rettali sono stati eseguiti su tutti i furetti ogni 24 ore. I campioni di sangue sono stati raccolti a 0, 4 e 8 giorni dopo l'infezione da furetto sorgente. Per tutti i furetti, sono stati raccolti organi per determinare i titoli del virus e la presenza di RNA virale in diversi tessuti.

Titolazione di SARS-CoV-2 in estratti di tessuto. Per la titolazione del virus, gli organi sono stati pesati e omogeneizzati in PBS. Gli omogenati sono stati centrifugati a 2.000 *g* per 5 min a 4 ° C. I supernatanti chiarificati sono stati raccolti e utilizzati nelle successive analisi della placca. Per il rilevamento dell'RNA virale, gli organi raccolti sono stati conservati in RNAlater a - 80 ° C. I tessuti sono stati macinati e l'RNA totale è stato estratto utilizzando un mini kit RNeasy (Qiagen). L'RNA è stato estratto dai tamponi rettali utilizzando un kit di RNA virale ZR (Zymo Research) in conformità con i protocolli del produttore.

Numeri di copie dell'RNA di SARS-CoV-2. Il rilevamento dell'RNA di SARS-CoV-2 è stato eseguito utilizzando il set di sonde primer nCoV_IP2 (Centro di riferimento nazionale per i virus respiratori, Institut Pasteur) mirato al SARS-CoV-2 *RdRp* gene. Un sistema di PCR in tempo reale Applied Biosystems 7500 che utilizza il sistema di PCR in tempo reale StepOnePlus è stato utilizzato per eseguire le reazioni RT - qPCR. La miscela master 1-step TaqMan Fast Virus (Thermo Fisher Scientific) è stata utilizzata in combinazione con il set di primer-sonda nCoV_IP2 per rilevare l'RNA virale. Per quantificare i numeri di copie dell'RNA, è stata creata una curva standard utilizzando un frammento PCR (nucleotidi 12669-14146 del genoma SARS-CoV-2) generato dal DNA virale complementare utilizzando il primer diretto nCoV_IP2 e il primer inverso nCoV_IP4. I valori di RNA sono stati normalizzati ai pesi dei tessuti utilizzati.

Interferone sistemico e profilo delle citochine. L'espressione relativa di interferone, ISG e citochine è stata determinata mediante analisi PCR in tempo reale. L'RNA è stato estratto dalle PBMC raccolte in vari momenti dopo l'infezione. Il DNA complementare è stato trascritto al contrario con SuperScript III (Invitrogen) utilizzando primer oligo-dT e analizzato mediante PCR in tempo reale utilizzando la master mix Fast SYBR Green (Applied Biosystems). I segnali sono stati normalizzati all'RNA messaggero della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, analizzato utilizzando il comparativo

ciclo soglia ($\Delta\Delta C_T$) metodo ed espresso rispetto al giorno 0 di infezione per ciascun rispettivo animale. Le sequenze dei primer utilizzati per le analisi sono mostrate in Tabella supplementare 13.

Statistiche e riproducibilità. I pacchetti software Microsoft Excel (versioni 16.42 e 16.43) e GraphPad Prism (versione 8.4.3) sono stati utilizzati rispettivamente per la maggior parte della raccolta e dell'analisi dei dati. I dati RT-qPCR della trascrizione inversa sono stati raccolti e analizzati utilizzando il pacchetto software StepOnePlus (versione 2.1; Applied Biosystems). Le figure finali sono state assemblate utilizzando Adobe Illustrator (versione CS6). ANOVA a una o due vie con confronti multipli di Dunnett, Tukey o Sidak sono stati utilizzati test post-hoc senza ulteriori aggiustamenti per valutare la significatività statistica quando sono stati confrontati più di due gruppi o set di dati contenevano due variabili indipendenti, rispettivamente. Il test statistico specifico applicato ai singoli studi è specificato nelle legende delle figure. I file Source Data riassumono le analisi statistiche (dimensione dell'effetto, gradi di libertà e *P* valori) dei rispettivi set di dati. Dimensioni dell'effetto tra

i gruppi negli ANOVA sono stati calcolati come $\eta^2 = (SS_{\text{effetto}}) / (SS_{\text{totale}})$ per ANOVA unidirezionale e $\omega^2 = (SS_{\text{effetto}} - (df_{\text{effetto}})(SM_{\text{errore}}) / SM_{\text{errore}} + SS_{\text{totale}})$ per ANOVA a due vie; SS_{effetto} , somma dei quadrati per l'effetto; SS_{totale} , somma dei quadrati per il totale; df_{effetto} ,

gradi di libertà per l'effetto; SM_{errore} , errore quadratico medio. Per determinare la potenza antivirale e la citotossicità, sono state calcolate le concentrazioni efficaci da dataset dose-risposta attraverso modelli di regressione a pendenza variabile a quattro parametri; i valori sono stati espressi con intervalli di confidenza del 95% quando possibile. Una ripetizione biologica si riferisce a misurazioni prese da campioni distinti, e i risultati ottenuti per ogni singola ripetizione biologica sono mostrati nelle figure insieme alla dimensione esatta (n , numero) di campioni, animali o esperimenti indipendenti biologicamente indipendenti. La misura del centro (linee di collegamento e colonne) è la media in tutto. Le barre di errore rappresentano la SD in tutto. Per tutti gli esperimenti, il livello di significatività statistica α era impostato su

< 0,05; esatto *P* i valori sono mostrati in grafici individuali o tabelle supplementari ove possibile.

Dichiarazione etica. Tutto il lavoro sugli animali è stato eseguito in conformità con la Guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio del National Institutes of Health e l'Animal Welfare Act Code of Federal Regulations. Esperimenti con SARS-CoV-2 che coinvolgono furetti sono stati approvati dal comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali dello Stato della Georgia con il protocollo A20031. Tutti gli esperimenti che utilizzano SARS-CoV-2 infettivo sono stati approvati dal Georgia State Institutional Biosafety Committee secondo il protocollo B20016 ed eseguiti in strutture BSL-3 / ABSL-3 presso la Georgia State University.

Riepilogo dei rapporti. Ulteriori informazioni sulla progettazione della ricerca sono disponibili nel sommario dei rapporti sulla ricerca sulla natura collegato a questo articolo.

Disponibilità dei dati

Tutti i dati generati o analizzati durante questo studio sono inclusi in questo articolo pubblicato. I dati di origine sono forniti con questo documento.

Disponibilità del codice

Questo studio non utilizza codici personalizzati. Tutti i codici di computer commerciali e gli algoritmi utilizzati sono specificati nella sezione Metodi.

Ricevuto: 3 novembre 2020; Accettato: 18 novembre 2020; Pubblicato: xx

Published online: 03 December 2020

Riferimenti

- Rodriguez Mega, E. COVID ha ucciso più di un milione di persone. Quanti altri moriranno? *Natura* <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02762-y> (2020).
- Martinot, M. et al. Fallimento di Remdesivir con mutazione RNA-polimerasi RNA dipendente da SARS-CoV-2 in un paziente immunodeficiente a cellule B con Covid-19 protratto. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1474> (2020).
- Humeniuk, R. et al. Sicurezza, tollerabilità e farmacocinetica di remdesivir, un antivirale per il trattamento di COVID-19, in soggetti sani. *Clin. Transl. Sci.* **13**, 896–906 (2020).
- Toots, M. et al. Caratterizzazione di farmaci antinfluenzali efficaci per via orale con barriera ad alta resistenza nei furetti e negli epitelii delle vie aeree umane. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaax5866 (2019).
- Toots, M. & Plemper, RK Terapie antinfluenzali ad azione diretta di nuova generazione. *Transl. Ris.* <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.01.005> (2020).
- Salajegheh Tazerji, S. et al. Trasmissione della sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2) agli animali: una revisione aggiornata. *J. Transl. Med.* **18**, 358 (2020).
- Oreshkova, N. et al. Infezione da SARS-CoV-2 nei visoni d'allevamento, Paesi Bassi, aprile e maggio 2020. *Euro Surveill.* <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005> (2020).
- Enserink, M. Coronavirus lacera gli allevamenti di visoni olandesi, provocando l'abbattimento. *Scienza* **368**, 1169 (2020).
- Oude Munnink, BB et al. Trasmissione di SARS-CoV-2 negli allevamenti di visoni tra umani e visoni e di nuovo all'uomo. *Scienza* <https://doi.org/10.1126/science.abe5901> (2020).
- Toots, M. et al. Paradigmi di efficacia quantitativa del candidato farmaco clinico influenzale EIDD-2801 nel modello del furetto. *Transl. Ris.* **218**, 16–28 (2020).
- Yoon, JJ et al. Inibitore dell'analogo ribonucleosidico ad ampio spettro, efficace per via orale, dell'influenza e dei virus respiratori sinciziali. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e00766-18 (2018).
- Urakova, N. et al. β -d-*N*₄ L'idrossicitidina è un potente anti-alfavirus composto che induce un alto livello di mutazioni nel genoma virale. *J. Virol.* **92**, e01965-17 (2018).
- Sheahan, TP et al. Un antivirale ad ampio spettro biodisponibile per via orale inibisce SARS-CoV-2 in colture di cellule epiteliali delle vie aeree umane e più coronavirus nei topi. *Sci. Transl. Med.* **12**, eabb5883 (2020).
- Han, K. et al. L'espressione polmonare dell'ACE2 umano sensibilizza il topo all'infezione da SARS-CoV-2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0354OC> (2020).
- Bruschke, C. *Ministero della Natura e della Qualità Alimentare dell'Agricoltura* (Ministro di Agricoltura, 2020).
- Schlottau, K. et al. SARS-CoV-2 in pipistrelli della frutta, furetti, maiali e polli: uno studio sperimentale sulla trasmissione. *Lancet Microbe* **1**, e218 – e225 (2020).
- Richard, M. et al. SARS-CoV-2 viene trasmesso tramite contatto e via aerea tra i furetti. *Nat. Commun.* **11**, 3496 (2020).
- Davies, NG et al. Effetti dipendenti dall'età nella trasmissione e nel controllo delle epidemie di COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 1205–1211 (2020).
- Agostini, ML et al. Antivirale a piccole molecole β -d-*N*₄ idrossicitidina inibisce un coronavirus intatto di correzione di bozze con un'elevata barriera genetica alla resistenza. *J. Virol.* **93**, e01348-19 (2019).
- Shi, J. et al. Suscettibilità di furetti, gatti, cani e altri animali domestici alla SARS-coronavirus 2. *Scienza* **368**, 1016–1020 (2020).
- Park, SJ et al. Efficacia antivirale dei farmaci approvati dalla FDA contro l'infezione da SARS-CoV-2 nei furetti. *mBio* **11**, e01114-20 (2020).
- Kutter, JS et al. SARS-CoV e SARS-CoV-2 vengono trasmessi attraverso l'aria tra i furetti a più di un metro di distanza. Preprint a *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.10.19.345363> (2020).
- Merck & Co. (Ridgeback Biotherapeutics) e Drug Innovations at Emory (DRIVE) - MK-4482 (precedentemente EIDD-2801). *Notizie di ingegneria genetica e biotecnologia* <https://www.genengnews.com/covid-19/ridgeback-biotherapeutics-and-drug-innovations-at-emory-drive/> (2020).
- Painter, GR et al. L'attività profilattica e terapeutica di un analogo del ribonucleoside ampiamente attivo in un modello murino di infezione da virus dell'encefalite equina venezuelana intranasale. *Antivir. Res.* **171**, 104597 (2019).
- Les, A., Adamowicz, L. & Rode, W. Struttura e conformazione di *N*₄-idrossicitosina e *N*₄-idrossi-5-fluorocitosina. Uno studio teorico ab initio. *Biochim. Biophys. Acta* **1173**, 39–48 (1993).
- Crotty, S., Cameron, CE & Andino, R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl Acad. Sci. Stati Uniti d'America* **98**, 6895–6900 (2001).
- Desmyter, J., Melnick, JL & Rawls, WE Difettività della produzione di interferone e dell'interferenza del virus della rosolia in una linea di cellule renali di scimmia verde africana (Vero). *J. Virol.* **2**, 955–961 (1968).
- Cox, RM et al. Inibitore allosterico ad ampio spettro della paramixovirus polimerasi per via orale. *Nat. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0752-7> (2020).
- Wolff, R. et al. Valutazione virologica dei pazienti ospedalizzati con COVID-19. *Natura* **581**, 465–469 (2020).

Ringraziamenti

Ringraziamo M. Kumar per aver fornito un'aliquota del titolo 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020, membri del GSUHigh Containment Core e del Dipartimento per la ricerca sugli animali per il supporto, e J. Sourimant e AL Hammond per la lettura critica del manoscritto. Questo lavoro è stato supportato, in parte, dai contributi del Servizio Sanitario Pubblico n. A1071002 (a RKP) e A1141222 (a RKP) da NIH / NIAID. I finanziatori non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio, nella raccolta e nell'interpretazione dei dati o nella decisione di presentare il lavoro per la pubblicazione.

Contributi dell'autore

RMC e JDW hanno eseguito la preparazione degli stock di virus; vaccinazioni animali; campionamenti e necroscopie; ha contribuito alla progettazione dell'esperimento, all'analisi dei dati e alla presentazione; e ha modificato il manoscritto. RMC ha eseguito tutti gli esperimenti e le analisi RT – qPCR. JDW ha eseguito tutte le analisi CBC. RKP ha ideato, progettato e coordinato lo studio; esperimenti concepiti e progettati; contribuito alle inoculazioni degli animali e alle necroscopie; ha contribuito all'analisi e alla presentazione dei dati; e ha scritto il manoscritto.

Interessi conflittuali

Gli autori non dichiarano interessi in competizione.

Informazioni aggiuntive

Dati estesi è disponibile per questo documento all'indirizzo <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00835-2>.

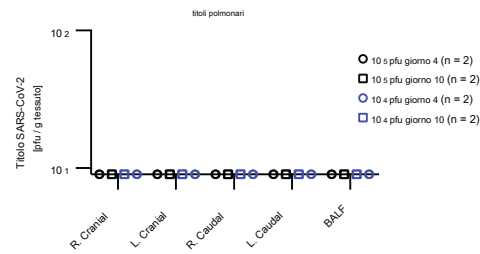
Informazione supplementare è disponibile per questo documento all'indirizzo <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00835-2>.

Corrispondenza e richieste di materiali dovrebbe essere indirizzato a RKP

Ristampe e informazioni sui permessi è disponibile all'indirizzo www.nature.com/reprints.

Nota dell'editore Springer Nature rimane neutrale riguardo alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e nelle affiliazioni istituzionali.

Dichiarazione di revisione tra pari *Nature Microbiology* ringrazia i revisori anonimi per il loro contributo alla peer review di questo lavoro. Sono disponibili rapporti di revisione tra pari. © The Author (s), su licenza esclusiva di Springer Nature Limited 2020



Dati estesi Fig. 1 | SARS-CoV-2 non progredisce nel tratto respiratorio inferiore del furetto. I furetti sono stati inoculati per via intranasale con 1×10^4 (blu) o 1×10^5 pfu (nero) del 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020. **un.** Analisi dei lavaggi bronchioalveolari (BALF) e quattro lobi polmonari (destro (R.) e sinistro (L.) craniale e caudale) per furetto. BALF e campioni di tessuti sono stati raccolti 4 (n = 2 animali biologicamente indipendenti) e 10 (n = 2 animali biologicamente indipendenti) giorni dopo l'infezione. Viene mostrato il numero di ripetizioni biologiche indipendenti. I simboli rappresentano ripetizioni biologiche indipendenti (singoli animali).

Extended Data 2a | Comparison of SARS-CoV-2 titers in nasal lavages of SARS-CoV-2 infected ferrets treated with different doses and dosing regimens

group	days pi	mean titer [pfu/ml]	SD [pfu/ml]	intergroup comparison: 5 mg/kg 12 hpi	
				vs 15 mg/kg 12 hpi ^A (P value)	vs 15 mg/kg 36 hpi (P value)
vehicle	0	<LoD	n.a. ^B	--	--
	0.5	5.33×10^2	4.93×10^2	--	--
	1	1.60×10^3	6.56×10^2	--	--
	1.5	1.33×10^3	5.77×10^2	--	--
	2	1.40×10^3	5.29×10^2	--	--
	2.5	3.33×10^2	3.21×10^2	--	--
	3	4.67×10^2	1.15×10^2	--	--
	3.5	6.33×10^1	3.21×10^1	--	--
5 mg/kg 12 hpi	0	<LoD	n.a.	--	--
	0.5	6.40×10^1	5.15×10^2	NS; 0.9982	NS; 0.9816
	1	8.67×10^1	4.51×10^1	NS; 0.997	NS; 0.068
	1.5	<LoD	n.a.	NS; 0.7106**	NS; 0.0669**
	2	<LoD	n.a.	NS; 0.7683**	0.0107**
	2.5	<LoD	n.a.	--	NS; 0.4711**
	3	<LoD	n.a.	--	--
	3.5	<LoD	n.a.	--	--
15 mg/kg 12 hpi	0	<LoD	n.a.	--	--
	0.5	5.53×10^2	5.64×10^2	--	NS; 0.9966
	1	9.00×10^1	6.08×10^1	--	NS; 0.1143
	1.5	16.33*	n.a.	--	NS; 0.053*
	2	12.67*	n.a.	--	0.0028*
	2.5	<LoD	n.a.	--	NS; 0.4711**
	3	<LoD	n.a.	--	--
	3.5	<LoD	n.a.	--	--
15 mg/kg 36 hpi	0	<LoD	n.a.	--	--
	0.5	4.33×10^2	4.04×10^2	--	--
	1	9.67×10^2	5.86×10^2	--	--
	1.5	2.10×10^3	2.54×10^1	--	--
	2	3.33×10^2	1.15×10^2	--	--
	2.5	23*	15.7	--	--
	3	<LoD	n.a.	--	--
	3.5	<LoD	n.a.	--	--

^Ahpi; hours post infection

^Bn.a.; not applicable

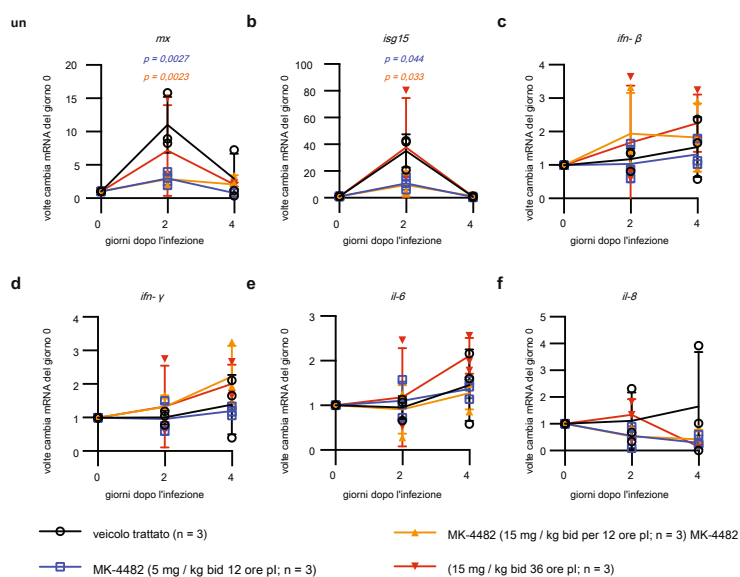
Extended Data 2b | SARS-CoV-2 titers in nasal turbinates of ferrets

group	days pi	mean titer [pfu/ml]	std dev. [pfu/ml]	intergroup comparison: 5 mg/kg 12 hpi	
				vs 15mg/kg 12hpi (P value)	vs 15 mg/kg 36 hpi (P value)
vehicle	4	2.81×10^3	3.28×10^3	--	--
5 mg/kg 12 hpi	4	<L.o.D	n.a.	NS; >0.9999**	NS; >0.9999**
15 mg/kg 12 hpi	4	<L.o.D	n.a.	--	NS; >0.9999**
15 mg/kg 36 hpi	4	<L.o.D	n.a.	--	--

Extended Data 2c | Viral RNA detected in nasal turbinates of ferrets

group	days pi	mean RNA [copies/g tissue]	std dev. [copies/g tissue]	intergroup comparison: 5 mg/kg 12 hpi	
				vs 15mg/kg 12hpi (P value)	vs 15 mg/kg 36 hpi (P value)
vehicle	4	1.13×10^6	6.24×10^5	--	--
5 mg/kg 12 hpi	4	1.16×10^5	7.10×10^4	NS; 0.9998	0.042
15 mg/kg 12 hpi	4	1.06×10^5	5.15×10^4	--	0.0378
15 mg/kg 36 hpi	4	8.64×10^5	6.25×10^5	--	--

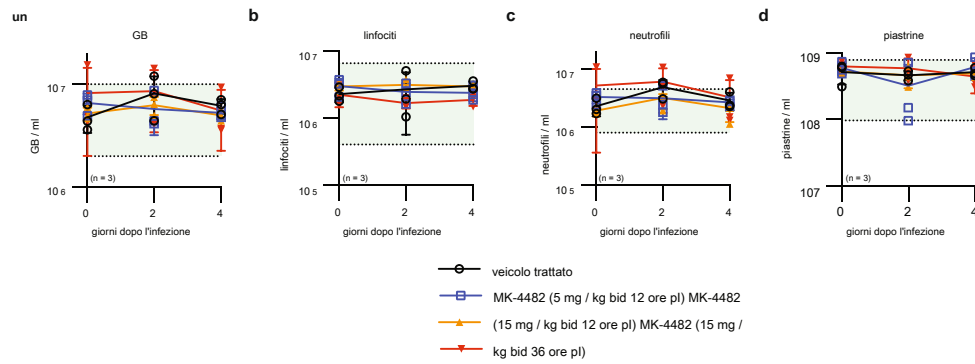
Dati estesi Fig. 2 | Mezzi sperimentali e confronto intergruppo dei risultati dello studio sull'efficacia di invivo di MK-4482 / EIDD-2801 in furetti infetti da SARS-CoV2. **un,** Confronto dei titoli SARS-CoV-2 nei lavaggi nasali di furetti infetti da SARS-CoV-2 trattati con dosi e regimi di dosaggio differenti. Titoli di virus medi $\pm$ Le SD sono mostrate per diversi giorni di studio (giorni pi). Il LOD era di 10 pfu (ab). I campioni al di sotto del LOD sono stati tracciati come 9 pfu **b,** Titoli di SARS-CoV-2 nei turbinati nasali di furetti da (a). Titoli di virus medi $\pm$ Vengono visualizzati SD. Il LOD era di 10 pfu (ab). **c,** RNA virale rilevato nei turbinati nasali dei furetti da (a). Numero medio di copie di RNA $\pm$ Vengono visualizzati SD. La significatività statistica è stata determinata tra diversi gruppi di trattamento. Il LOD era 1 copia di RNA, i campioni al di sotto del LOD sono stati tracciati come 1 copia di RNA. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA bidirezionale (a) o unidirezionale (bc) con il test post-hoc di confronto multiplo di Tukey. Vengono visualizzati i valori P. (*) indica campioni in cui una o due ripetizioni erano inferiori al LOD. (**) indica che tutte e tre le ripetizioni per almeno un gruppo di dosaggio erano inferiori al LOD.



Dati estesi Fig. 3 | Induzione dell'interferone e profilo delle citochine di furetti SARS-CoV-2 trattati con MK-4482 / EIDD-2801. I furetti (n = 3 animali biologicamente indipendenti) sono stati infettati per via nasale con 1×10^5 pfu 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020 e gavaged con veicolo (nero (af)) o trattati

offerta con MK-4482 / EIDD-2801 che iniziano 12 (5 mg / kg (blu (af)) e 15 mg / kg (arancione (af)) o 36 ore (15 mg / kg; rosso (af)) dopo l'infezione.

af, Livelli di espressione selezionati di interferone e citochine nelle PBMC rispetto al giorno 0. Campioni di sangue di animali trattati con MK-4482 / EIDD-2801 o veicolo come specificato sono stati raccolti ogni due giorni dopo l'infezione e le PBMC analizzate mediante RT-qPCR. Analisi statistica dei cambiamenti relativi al giorno 0 mediante ANOVA a due vie con il test di confronto multiplo post-hoc di Dunnett. Viene mostrato il numero di ripetizioni biologiche indipendenti (n; singoli animali). In tutti i pannelli, i simboli rappresentano ripetizioni biologiche indipendenti (singoli animali), le linee collegano mezzi di gruppo $\pm$ SD.



Dati estesi Fig. 4 | Emocromo completo dei furetti SARS-CoV-2 trattati con MK-4482 / EIDD-2801. I furetti ($n = 3$ animali biologicamente indipendenti) sono stati infettati per via nasale con 1×10^5 pfu 2019-nCoV / USA-WA1 / 2020 e gavaged con veicolo (nero (af)) o trattati *offerta* con MK-4482 / EIDD-2801 che inizia 12 (5 mg / kg (blu (af)) e 15 mg / kg (arancione (af)) o 36 ore (15 mg / kg; rosso (af)) dopo l'infezione. **anno Domini**, I campioni di sangue sono stati raccolti ogni due giorni dopo l'infezione e sono stati determinati gli emocromi completi. Non sono stati osservati valori anormali in tutti i parametri testati, inclusi globuli bianchi totali (a), linfociti (b), neutrofili (c) e piastrine (d). Le aree verdi ombreggiate rappresentano i normali valori di laboratorio di Vetscan HM5. Il numero di ripetizioni biologiche indipendenti (n ; singoli animali) è mostrato per ogni sottopannello. I simboli rappresentano ripetizioni biologiche indipendenti (singoli animali), le linee collegano mezzi di gruppo $\pm$ SD.

Riepilogo dei rapporti

Nature Research desidera migliorare la riproducibilità del lavoro che pubblichiamo. Questo modulo fornisce la struttura per la coerenza e la trasparenza nel reporting. Per ulteriori informazioni sulle politiche di ricerca sulla natura, consultare il nostro [Politiche editoriali](#) e il [Elenco di controllo della politica editoriale](#).

Statistiche

Per tutte le analisi statistiche, verificare che i seguenti elementi siano presenti nella legenda della figura, nella legenda della tabella, nel testo principale o nella sezione Metodi. n / a Confermato

- ☐ ☒ La dimensione esatta del campione (n) per ogni gruppo / condizione sperimentale, dato come numero discreto e unità di misura
- ☐ ☒ Una dichiarazione che indica se le misurazioni sono state prese da campioni distinti o se lo stesso campione è stato misurato ripetutamente I test statistici utilizzati E
- ☐ ☒ se sono a una o due code
Solo i test comuni dovrebbero essere descritti esclusivamente per nome; descrivere tecniche più complesse nella sezione Metodi.
- ☒ ☐ Una descrizione di tutte le covariate testate
- ☐ ☒ Una descrizione di eventuali ipotesi o correzioni, come test di normalità e aggiustamento per confronti multipli
- ☐ ☒ Una descrizione completa dei parametri statistici, inclusa la tendenza centrale (ad es. Medie) o altre stime di base (ad es. Coefficiente di regressione) E variazione (ad es. Deviazione standard) o stime associate dell'incertezza (ad es. Intervalli di confidenza)
- ☐ ☒ Per il test di ipotesi nulla, la statistica del test (es F , t , r) con intervalli di confidenza, dimensioni degli effetti, gradi di libertà e P valore annotato
Fornire valori P come valori esatti ogni volta che è opportuno.
- ☒ ☐ Per l'analisi bayesiana, informazioni sulla scelta dei priori e impostazioni Monte Carlo della catena di Markov
- ☒ ☐ Per progetti gerarchici e complessi, identificazione del livello appropriato per i test e reporting completo dei risultati Stime delle dimensioni degli
- ☒ ☐ effetti (ad es. d , Pearson's r), indicando come sono stati calcolati

La nostra raccolta web su [statistiche per i biologi](#) contiene articoli su molti dei punti precedenti.

Software e codice

Informazioni sulla politica su [disponibilità di codice informatico](#)

Raccolta dati

Excel (versioni 16.42 e 16.43; Microsoft) è stato utilizzato per la maggior parte della raccolta dati. I dati qPCR di trascrizione inversa sono stati raccolti utilizzando un sistema PCR StepOnePlus Applied Biosystems utilizzando il software StepOnePlus (versione 2.1; Applied Biosystems).

Analisi dei dati

Le analisi statistiche sono state eseguite nel pacchetto software Prism (GraphPad) (versione 8.4.3). Le figure sono state composte utilizzando Adobe Illustrator (versione CS6).

Per i manoscritti che utilizzano algoritmi personalizzati o software che sono centrali per la ricerca ma non ancora descritti nella letteratura pubblicata, il software deve essere messo a disposizione di editori e revisori. Incoraggiamo fortemente la deposizione del codice in un repository della comunità (ad esempio GitHub). Vedi la ricerca sulla natura [linee guida per l'invio di codice e software](#) per maggiori informazioni.

Dati

Informazioni sulla politica su [disponibilità dei dati](#)

Tutti i manoscritti devono includere un file [dichiarazione sulla disponibilità dei dati](#). Questa dichiarazione dovrebbe fornire le seguenti informazioni, ove applicabile:

- Codici di adesione, identificatori univoci o collegamenti Web per set di dati disponibili pubblicamente
- Un elenco di cifre a cui sono associati dati grezzi
- Una descrizione di eventuali limitazioni alla disponibilità dei dati

Tutti i dati generati o analizzati durante questo studio sono inclusi in questo articolo pubblicato (e nei suoi file di informazioni supplementari). I dati di origine per le figure 1-3 e le figure di dati estesi 1-3 sono forniti con il documento nel file di dati supplementari 1.

Rapporti specifici per campo

Seleziona quello di seguito che è più adatto alla tua ricerca. Se non sei sicuro, leggi le sezioni appropriate prima di effettuare la selezione.

- ☒ Scienze di vita ☐ Scienze comportamentali e sociali ☐ Scienze ecologiche, evolutive e ambientali

Per una copia di riferimento del documento con tutte le sezioni, vedere [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://www.nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

Progettazione di studi di scienze della vita

Tutti gli studi devono divulgare su questi punti anche quando la divulgazione è negativa.

Misura di prova	Le dimensioni appropriate del campione sono state determinate utilizzando l'equazione delle risorse e l'analisi della potenza. Salvo diversa indicazione, sono stati utilizzati almeno tre campioni per ciascun gruppo.
Esclusioni di dati	Nessun dato è stato escluso da questo manoscritto.
Replica	Tutti i dati sperimentali sono stati prodotti in modo affidabile; il numero di ripetizioni biologiche indipendenti (almeno tre) e, quando applicabile, di ripetizioni tecniche è specificato per ogni esperimento.
Randomizzazione	Animali e campioni sono stati suddivisi in modo casuale in gruppi sperimentali.
Accecante	I ricercatori non sono stati all'oscuro dell'allocatione di gruppo per la raccolta e l'analisi dei dati per qualsiasi esperimento eseguito in questo studio a causa delle dimensioni del gruppo di ricerca con autorizzazione per la sperimentazione in condizioni di alto biocontenimento richieste per lavorare con SARS-CoV-2 vivo. I furetti sono animali di grandi dimensioni che non possono essere gestiti da un singolo investigatore e le risorse disponibili non hanno consentito il coinvolgimento di personale aggiuntivo che sarebbe stato necessario per l'accecamento.

Reporting per materiali, sistemi e metodi specifici

Abbiamo bisogno di informazioni dagli autori su alcuni tipi di materiali, sistemi sperimentali e metodi utilizzati in molti studi. Indica qui se ogni materiale, sistema o metodo elencato è rilevante per il tuo studio. Se non sei sicuro che un elemento dell'elenco si applichi alla tua ricerca, leggi la sezione appropriata prima di selezionare una risposta.

Materiali e sistemi sperimentali

n / a	Coinvolto nello studio
☒	☐ Anticorpi
☐	☒ Linee cellulari eucariotiche
☒	☐ Paleontologia e archeologia
☐	☒ Animali e altri organismi Partecipanti
☒	☐ alla ricerca umana
☒	☐ Dati clinici
☒	☐ Ricerca a duplice uso preoccupante

Metodi

n / a	Coinvolto nello studio
☒	☐ ChIP-seq
☒	☐ Citometria a flusso
☒	☐ Neuroimaging basato su MRI

Linee cellulari eucariotiche

Informazioni sulla politica su [linee cellulari](#)

Sorgenti della linea cellulare	Cellule Vero-E6, ottenute da ATCC.
Autenticazione	Le cellule sono state autenticate in base all'aspetto morfologico e alla suscettibilità all'infezione da virus, incluso SARS-CoV-2.
Contaminazione da micoplasma	Le linee cellulari sono state confermate negative al micoplasma quando ottenute dal fornitore, seguite dalla preparazione e dalla crioconservazione delle scorte master e di lavoro. Le singole scorte di lavoro venivano sostituite ogni tre mesi. Tutte le linee cellulari in uso in laboratorio sono state testate di routine per la contaminazione da micoplasma a intervalli di 6 mesi e sono risultate negative.
Linee comunemente identificate erroneamente (Vedere ICLAC Registrati)	In questo studio non sono state utilizzate linee cellulari comunemente identificate erroneamente.

Animali e altri organismi

Informazioni sulla politica su [studi su animali](#); [ARRIVE linee guida](#) raccomandato per la segnalazione di ricerche sugli animali

Animali da laboratorio	Questo studio ha utilizzato furetti femmina (<i>Mustela putorius furo</i>), mustelidi familiari, genere <i>mustela</i> , 6-10 mesi di età.
------------------------	--

Animali selvaggi

Questo studio non ha coinvolto animali selvatici.

Campioni raccolti sul campo

Questo studio non ha coinvolto campioni raccolti sul campo.

Controllo etico

Esperimenti con SARS-CoV-2 che coinvolgono furetti sono stati approvati dal comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali dello Stato della Georgia con il protocollo A20031. Tutti gli esperimenti che utilizzano SARS-CoV-2 infettiva sono stati approvati dal Georgia State Institutional Biosafety Committee in base al protocollo B20016.

Si noti che nel manoscritto devono essere fornite anche tutte le informazioni sull'approvazione del protocollo di studio.