

# SARS および MERS コロナウイルス

## 受託試験サービスのご案内

Southern Research Institute(以下、当社)は、SARS-CoV-2(通称 新型コロナウイルス)の臨床株 BetaCoV/USA/WA1/2020 を入手し、同ウイルスによる感染症のワクチンおよび治療薬開発を支援する受託試験サービスの展開を開始致しました。

### 1. コロナウイルス関係の試験サービスの背景

当社は、新型ウイルスの出現に速やかに対応するため、最新のウイルス種を保持し続けています。SARSの2002-2003の一定地域における流行以来、米国NIAID<sup>1)</sup>-DMID<sup>2)</sup>との契約に基づき、当社は低および高スループットでのPrimary CPE Assayとplaque assayを行うSARS-コロナウイルスプログラムを構築しています。

現在、当社は、SARS-CoV Torono-2株の入手と試験実施の承認を受け、ストックされたウイルスの特性検査を実施し、必要となるすべての生物学的研究と規制に対するBSL-3施設を整えています。

MERS-CoVについては、Erasmusメディカル・センターから入手され、SARSのためのすべてのプロトコールがMERS用に適応されており、従事するすべてのスタッフは、このウイルスファミリーの試験を行うために訓練され、IBC<sup>3)</sup>承認が得られています。

これらの試験は、CDC<sup>4)</sup>の認可を受けたSR社のBSL3+施設にて実施されます。

<sup>1)</sup>NIAID:National Institute of Allergy and Infectious Diseases(アメリカ国立アレルギー・感染症研究所)

<sup>2)</sup>DMID:Division of Microbiology and Infectious Diseases(微生物感染症局)

<sup>3)</sup>IBC: Institutional Biosafety Committee (企業内安全対策委員会)

<sup>4)</sup>CDC: Centers for Disease Control and Prevention(アメリカ疾病予防管理センター)

### 試験使用可能なSARS-コロナウイルスとMERS-コロナウイルス

Panel	Viruses	Containment Level	Recommended Strain
Panel 2	MERS-CoV	BSL-3/3+	Hu/Jordan-N3/2012
	SARS-CoV		Toronto -2
Panel 5	MERS-CoV	BSL-3/3+	Hu/Jordan-N3/2012
	SARS-CoV		Toronto-2

当社は、試験に使用するCoVのウイルス株を生産する機能を有し、SARS TOR2(SR社株No. SRI-P2b)は約 $10^7$  TCID50/mLに増殖させ、測定方法のValidation試験を完了しています。

## 2. コロナウイルス関係試験サービスの実績と今後の展望等

### 1) In vitro 試験

NIAID からの助成金(U19 grant)の一部として、SR 社は、2014 年に、SARS に対してトロント株を用いた CPE assay(ペロ細胞)を BSL-3 下でハイスループット・スクリーニングを実施し、SARS に対する有効性をいくつか確認しました。この際、その助成金の協力者から NanoLuc reporter ウイルスを手し、抗ウイルス薬の評価のための Assay 方法を確立しました。

### コロナウイルス関連 in vitro 試験一覧

Virus or Antigen	Assay Type	Cell-line	Endpoint
<b>SARS-CoV Toronto 2</b>	CPE reduction	Cell-based/Vero E6	Range of action
<b>MERS-CoV Hu/Jordan-N3/2012</b>	CPE reduction	Cell-based/Vero	Range of action
<b>MERS-CoV EMC/2012</b>	CPE reduction	Cell-based/Vero	Range of action
<b>SARS-CoV S protein*</b>	ELISA	NA	Antibody titers (Human serum)
<b>SARS-CoV Toronto 2</b>	RT-PCR	NA	Tissues and Blood Viral load <sup>1</sup>
<b>SARS-CoV Toronto 2</b>	TCID <sub>50</sub>	Vero E6	Viral Load (nasal swab, nasal turbinate and lung) <sup>1</sup>
<b>SARS-CoV-2 BetaCoV/USA/WA1/2020</b>	Assay development is in progress with 2020 SARS-CoV-2 isolate.		

\*Assay is validated under GLP

<sup>1</sup> Assays were established under BSL-3 to support animal efficacy study (ferret)

当社は、ワクチンおよび抗ウイルス性の開発と臨床試験のニーズを満たすように、迅速に対応することが可能であり、新種のウイルスに対する必要となるアッセイ構築を実施致します。

米国 NIAID-DMID との契約(ELISA to Measure Human Antibodies against the S-Protein of SARS-CoV)下の試験で、SARS コロナウイルスのスパイクタンパク(S protein)に対するヒト血清中抗体検出のための酵素免疫測定(ELISA 法)を実施しています。本 Assay の陽性対照として、プールされたヒトポリクローナル抗血清(pAb)が用いられ、その結果として、患者サンプル中の抗 SARS 抗体は力価として評価されています。

当社は、2019-nCoV(すなわち、新型コロナウイルス)について NCBI<sup>\*</sup>で公開されたシーケンスデータベース検索を開始し、いくつかのシーケンスがアップロードされています。VM Corman らの報告によれば(VM Corman et al. Euro Surveill 25 (3). Jan 2020)、いくつかの 2019-nCoV のシーケンスが 2020 年 1 月 10 日(感染拡大前)にアップロードされ、さらに 2020 年 1 月 12 日に 4 つのシーケンスが追加されています。現在、中国、オーストラリアおよび米国からの代表的な武漢 Hi-1 ウイルスについての 18 種の完全な遺伝子シーケンスがあり、大抵スパイク(S)遺伝子と RNA 依存性レプリカーゼコンプレックス(RDRP)から複数の部分的なシーケンスがあります。当社は、SARS 似のコロナウイルスの検出と 2019-nCoV の特異的検出のための定量的 RT-PCR 分析物を確立するために、機能と専門知識を有します。

<sup>\*</sup>NCBI:National Center for Biotechnology Information(国立生物工学情報センター)

上述の通り、当社は、SARS-CoV-2(通称 新型コロナウイルス)の臨床株 BetaCoV/USA/WA1/2020 を入手し、BSL-3(封じ込め)施設での増殖を開始し、In vitro 試験を間もなく受託開始します。

## 2) In vivo 試験

当社は、NIAID/NIH 出資プロジェクトのもと、フェレットを用いた SARS-CoV に対するワクチン候補品の有効性や毒性評価を実施しております。フェレットのモデルについては論文化されています(第 3 項 5 に示します)。フェレットに対する SARS-CoV-2(新型コロナウイルス)の試験に関しては、入手したウイルスのウイルス生成/特徴付け後に速やかに試験実施可能です。

また、豊富な霊長類による感染実験の実績に基づき、SARS-CoV-2(新型コロナウイルス)に対する霊長類の試験(鼻腔内/気管内投与での感染モデル試験)の受託を本年 5 月までに開始する予定です。

マウスモデルは、規定の遺伝子改変マウスの入手に 6-7 か月の時間を有するため、速やかな試験実施は難しい状況ではありますが、代替として、SARS-CoV (2002 strain)を感染させるモデル等が提供可能かと見られます。

## 発表論文

当社のさらなる経験／実績については、以下の発表論文をご参照ください(太字が当社のサイエンティストです)。なお、当社には日本人サイエンティストが所属し、ワクチン／抗ウイルス薬の有効性の専門家ですので、サイエンスの協議も日本語で対応することが可能です。

1. Mueller S., Stauff C.B., **Kalkeri R.**, **Koide F.**, Kushnir A., Tasker S., Coleman J., (2020). A codon-pair deoptimized live-attenuated vaccine against respiratory syncytial virus is immunogenic and efficacious in non-human primates. *Vaccine*. 38 (14); 2943-2948. (2020) A codon-pair deoptimized live-attenuated vaccine against respiratory syncytial virus is immunogenic and efficacious in non-human primate model. *Vaccine*. 38(14), 2943-2948.
2. Hurst, K, R., Ye, R., **Goebel, S.J.**, Jayaraman, P., Masters, P.S. 2010. An Interaction between the Nucleocapsid Protein and a Component of the Replicase-Transcriptase Complex is Crucial for the Infectivity of Coronavirus Genomic RNA. *Journal of Virology*, 84(19), 10276-88. PMID: PMC2937748.
3. Koetzner CA, Kuo L, **Goebel SJ**, Dean AB, Parker MM, Masters PS. Accessory protein 5a is a major antagonist of the antiviral action of interferon against murine coronavirus. *Journal of Virology*. 2010 Aug;84(16):8262-74. PMID: 20519394; PMID: PMC2916514.
4. Züst, R., Miller, T.B., **Goebel, S.J.**, Thiel, V., Masters, P.S. 2008. Genetic Interactions Between the 3' cis-Acting Element of the Mouse Coronavirus Genome and Replicase Gene Products. *Journal of Virology*, 82, 1214-28. PMID: PMC2224451
5. **Chu, Y.K., Ali, G.D., Jia, F., Li, Q.**, Kelvin, D., Couch, R.C., Harrod, K.S., Hutt, J.A., Cameron, C., Weiss, S.R., **Jonsson, C.B.**, 2008. The SARS-CoV ferret model in an infection-challenge study. *Virology* 374, 151-163.
6. **Goebel, S.J.**, Miller, T.B., Bennett, C.J., Bernard, K.A., Masters, P.S. 2007. Hypervariable Region within the 3' Cis-Acting Element of the Murine Coronavirus Genome is Nonessential for RNA Synthesis but Affects Pathogenesis. *Journal of Virology*, 81, 1274-1287. PMID: PMC1797510
7. **Severson, W.E., Shindo, N., Sosa, M., Fletcher, T., 3rd, White, E.L., Ananthan, S., Jonsson, C.B.** 2007. Development and validation of a high-throughput screen for inhibitors of SARS CoV and its application in screening of a 100,000-compound library. *J Biomol Screen* 12, 33-40.
8. **Goebel SJ**, Taylor J, Barr BC, Kiehn TE, Castro-Malaspina HR, Hedvat CV, Rush-Wilson KA, Kelly CD, Davis SW, Samsonoff WA, Hurst KR, Behr MJ, Masters PS. Isolation of avian paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia. *J Virol*. 2007 Nov;81(22):12709-14. PMID: 17855523; PMID: PMC2168997.
9. Puig-Bassagoiti, F., Tilgner, M., Forshey, B.M., Philpott, S.M., Espina, N.G., Wentworth, D.E., **Goebel, S.J.**, and Masters, P.S., Falgout, B., Ren, P., Ferguson, D.M., Shi, P.Y., 2006. A Triaryl Pyrazoline Compound Inhibits Flavivirus RNA Replication. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 50, 1320-1329. PMID: PMC1426921.
10. **Goebel, S.J.**, Taylor, J., and Masters, P.S. 2004. The 3' cis-Acting Genomic Replication Element of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Can Function in the Murine Coronavirus Genome. *Journal of Virology*, 78, 7846-7851. PMID: PMC434098
11. **Goebel, S.J.**, Hsue, B., Dombrowski, T., and Masters, P.S. 2004. Characterization of the RNA Components of a Putative Molecular Switch in the 3' Untranslated Region of the Murine Coronavirus Genome. *Journal of Virology*, 78, 669-682. PMID: PMC368785