# CTD 第 2 部

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
  - 2.6.1 緒言

MSD 株式会社

#### グラゾプレビル/エルバスビル

# 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

# 2.6.1 緒言

# 目次

		頁
図一覧		. 2
2.6.1	緒言	. 3

#### グラゾプレビル/エルバスビル

# 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

# 2.6.1 緒言

# 図一覧

図 2.6.1-1 グラゾプレビルの化学構造式			具
図 2612 エルバスビルの化学構造式	図 2.6.1-1	グラゾプレビルの化学構造式	3
ろ	図 2.6.1-2	エルバスビルの化学構造式	Δ

2.6.1 緒言

#### 2.6.1 緒言

C型肝炎ウイルス(HCV)の非構造蛋白質(NS)3/4A に強力かつ可逆的に結合する大環状構造の阻害剤であるグラゾプレビル(別名 MK-5172又は )、及び HCV NS5A の強力な低分子阻害剤であるエルバスビル(別名 MK-8742又は )の併用投与法は、遺伝子型(GT)1、3、4及び6の HCV 慢性感染患者に対して高い有効性と忍容性、1日1回の容易な服薬とともにペグインターフェロン不要な短期間療法を提供するために開発された。本邦では HCV GT1 感染患者に対して、リバビリン不使用のグラゾプレビル/エルバスビル12週間投与レジメンが提案されている。グラゾプレビル/エルバスビルの臨床推奨用量は、100 mg/50 mg である。

グラゾプレビルは *in vitro* の細胞複製試験において、HCV NS 3/4A に対して強力かつ可逆的に結合する大環状構造の阻害剤である。グラゾプレビルは、第一世代 HCV プロテアーゼ阻害剤の臨床試験において同定された、すべての HCV 遺伝子型及び多くの耐性変異(RAV)に対して強い活性を有している。グラゾプレビルは、エラスターゼやトリプシンなど他のセリンプロテアーゼとの優れた選択性を示し(阻害は検出感度以下)、キモトリプシンに対してごくわずかな阻害を示した( $IC_{50}$  = 1495 nM、>100,000倍の選択性)。グラゾプレビルの化学構造式を[図 2.6.1-1]に示す。

図 2.6.1-1 グラゾプレビルの化学構造式

HCV NS3/4A 遺伝子は、ウイルス複製に必須の活性蛋白質である HCV ポリ蛋白質に対して4ヵ 所での特異的切断を担う、セリンプロテアーゼをコードしている。HCV ポリ蛋白質の正確かつ適切なプロセシングが、活性をもつウイルス複製複合体を構築・成立させるために不可欠である。したがって、このプロテアーゼ活性の阻害により、ウイルス複製が遮断されると考えられる。

本ウイルス複製の阻害機序については、既存のプロテアーゼ阻害剤であるバニプレビル、テラ プレビル及びシメプレビルにより、臨床での効果及び阻害活性の証明(proof-of-activity)が示さ れている。グラゾプレビルは、既存の上述したプロテアーゼ阻害剤に比べ、いくつかの利点を備 えている。すなわち、グラゾプレビルは HCV GT1~6すべてに対して活性を有する最も強力な NS3/4A 阻害剤であり、既存の HCV プロテアーゼ阻害剤でみられた臨床で重要な RAV に関して 効力が増強されている。

エルバスビルは、HCV 複製時の必須蛋白質である HCV NS5A に対する、強力な低分子阻害剤 である。エルバスビルは HCV の全遺伝子型に対して強力な活性を有し、かつ NS5A に選択的で ある。ヒトでは HCV NS5A が既知のオルソログをもたないという事実により、更にエルバスビル の選択性が高められている。エルバスビルの化学構造式を[図 2.6.1-2]に示す。

図 2.6.1-2 エルバスビルの化学構造式

NS5A は HCV 複製に必須のウイルスリン酸化蛋白質である。NS5A は、良好なウイルス複製を 抑制しうる多くの細胞プロセス(アポトーシス、細胞周期、自然免疫、膜の生合成など)に関わ る多様な宿主の蛋白質と、相互に作用している。NS5A には明確に示された酵素活性はないが、 ウイルス複製には不可欠である。主な突然変異、例えばリボ核酸(RNA)結合を妨げる突然変異 は、ウイルスの複製を阻害する。NS5A は、耐性選択試験を通じて標的分子として実証され、逆 遺伝学的方法 (reverse genetics) により効力の喪失が確認されている。この機序については、ダク ラタスビル、レジパスビル及びオムビタスビルによって、臨床での効果及び阻害活性の証明 (proof-of-activity) が示されている。

複数の HCV 遺伝子型において、また既存の化合物でみられた臨床で重要な RAV においてより 高い効力を有していることから、エルバスビルは主として GT1-感染患者を対象にこれまで承認さ れている NS5A 阻害剤を上回っている。

HCV 慢性感染治療のため併用投与でのグラゾプレビル及びエルバスビルの開発を支持するた めに実施した、非臨床薬理試験、薬物動態及び毒性試験の概要を、モジュール2.6の以降のセクシ ョンに示した。概して、グラゾプレビル及びエルバスビルの非臨床プロファイルは十分に検討さ れており、HCV 感染患者でのグラゾプレビル及びエルバスビル併用投与時の推奨用量(それぞれ 100 mg 及び50 mg) における有効性及び安全性の裏付けとなっている。

# CTD第2部

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
  - 2.6.2 薬理試験の概要文

MSD 株式会社

# 目次

		頁
表一覧		3
図一覧		6
略号及び用語の定義		7
2.6.2.1 要約		9
2.6.2.A セクショ	ン A : グラゾプレビル	12
2.6.2.A.2 効力を	を裏付ける試験	12
2.6.2.A.2.1 In	n Vitro 試験	12
2.6.2.A.2.1.1	阻害活性	12
2.6.2.A.2.1.2	耐性型分析	20
2.6.2.A.2.1.3	一過性導入ウイルスアッセイ	29
2.6.2.A.2.1.4	交差耐性	31
2.6.2.A.2.1.5	併用試験	35
2.6.2.A.2.2 In	n Vivo 試験	41
2.6.2.A.3 副次的	り薬理試験	42
2.6.2.A.3.1 In	n Vitro 薬理試験	42
2.6.2.A.3.1.1	グラゾプレビルの非標的分子に対する活性	42
2.6.2.A.3.1.2	カルボキシルエステラーゼ1/2及びカテプシン A の阻害作用	
2.6.2.A.3.1.3	他のウイルスに対するグラゾプレビルの活性	43
2.6.2.A.4 安全性	生薬理試験	46
2.6.2.A.4.1	安全性薬理試験	47
2.6.2.A.4.1.1	哺乳類細胞に安定発現させた hERG (IK <sub>r</sub> )、hKCNQ1/hKCNE1 (IK <sub>s</sub> )	
	及び hNav1.5 (IN <sub>a</sub> ) 電流に対する作用	
2.6.2.A.4.1.2	hERG 電流に対する作用	
2.6.2.A.4.1.3	イヌ(麻酔下)の心血管系に対する作用:探索試験	
2.6.2.A.4.1.4	イヌ(覚醒下)の心血管系及び呼吸系に対する作用	48
2.6.2.A.4.1.5	ラット経口投与時の機能観察総合評価	
2.6.2.A.4.1.6	ラット経口投与時の機能観察総合評価	
2.6.2.A.4.2	その他の試験	49
2.6.2.A.4.2.1	In vivo 肝臓反応アッセイ	49
	学的薬物相互作用	
	ン B : エルバスビル	
•	を裏付ける試験	
2.6.2.B.2.1 In	n Vitro 試験	51
2.6.2.B.2.1.1	阻害活性	51

#### 2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.B.2.1.2	耐性型分析	56
2.6.2.B.2.1.3	交差耐性	65
2.6.2.B.2.1.4	併用試験	70
2.6.2.B.2.2	In Vivo 試験	73
2.6.2.B.3 副涉	的薬理試験	74
2.6.2.B.3.1	In vitro 薬理試験	74
2.6.2.B.3.1.1	エルバスビルの非標的分子に対する活性	74
2.6.2.B.3.1.2	他のウイルスに対するエルバスビルの活性	76
2.6.2.B.4 安全	:性薬理試験	79
2.6.2.B.4.1	安全性薬理試験	80
2.6.2.B.4.1.1	哺乳類細胞に安定発現させた HERG (IK <sub>r</sub> )、HKCNQ1/hKCNE1 (IK <sub>s</sub> )	
	及び hNav1.5 (IN <sub>a</sub> ) 電流に対するエルバスビルの作用	80
2.6.2.B.4.1.2	CHO細胞に安定発現させたhERGチャネル電流における電気生理学	
	的評価	81
2.6.2.B.4.1.3	心血管系への影響を評価するラットでのテレメトリー試験	81
2.6.2.B.4.1.4	心血管系への薬理学的影響を評価するビーグルでのテレメトリー試	
	験	81
2.6.2.B.4.1.5	経口投与による呼吸機能への影響を評価するビーグルでのテレメト	
	リー試験	81
2.6.2.B.4.1.6	小核試験及び機能観察総合評価を含むラットの14日間経口投与毒性	
	試験	82
2.6.2.B.4.2	その他の試験	82
2.6.2.B.4.2.1	雌雄ラットを用いた探索的4日間経口投与安全性リード最適化試験	82
2.6.2.B.4.2.2	In Vivo 肝臟反応試験	83
2.6.2.B.4.2.3	イヌを用いた経口投与での探索的薬理試験	83
2.6.2.B.5 薬力	]学的薬物相互作用	84
2.6.2.3 考察及7	バ結論	85
2.6.2.3.1 In v	itro 及び in vivo 試験のまとめ:グラゾプレビル	85
2.6.2.3.2 In v	itro 及び in vivo 試験のまとめ:エルバスビル	85
2.6.2.3.3 安全	:性薬理試験のまとめ:グラゾプレビル/エルバスビル	86
<b>乡</b> 孝士龄		90

# 表一覧

			頁
表	2.6.2.A-1	種々の genotype でのグラゾプレビルの in vitro 酵素阻害活性	12
表	2.6.2.A-2	ProSEAP 表現型アッセイにおける NS3/4A genotype パネルに対する グラゾ	
		プレビルの in vitro 活性	13
表	2.6.2.A-3	ProSEAP 表現型アッセイにおける GT1a 及び GT1b 臨床分離株に対する グ	
		ラゾプレビルの活性	14
表	2.6.2.A-4	GT 1及び GT2レプリコンに対するグラゾプレビルの活性 ª	15
表	2.6.2.A-5	GT3レプリコンに対するグラゾプレビルの活性 <sup>a</sup>	15
表	2.6.2.A-6	GT4レプリコンに対するグラゾプレビルの活性 <sup>a</sup>	16
表	2.6.2.A-7	GT 5レプリコンに対するグラゾプレビルの活性 <sup>a</sup>	16
表	2.6.2.A-8	GT 6レプリコンに対するグラゾプレビルの活性 a	17
表	2.6.2.A-9	NS5A 及び NS5B 変異パネルに対するグラゾプレビルの活性	18
表	2.6.2.A-10	細胞培養におけるグラゾプレビルの細胞毒性	19
表	2.6.2.A-11	グラゾプレビルの GT1b Con1レプリコンでの耐性コロニー選択	21
表	2.6.2.A-12	グラゾプレビルの GT1a、GT2a、GT3a、GT4a、GT5a 及び GT6a レプリコン	
		での耐性コロニー選択	21
表	2.6.2.A-13	野生型及び変異型レプリコンに対するグラゾプレビルの活性:HCVレプリ	
		コンアッセイ*	24
表	2.6.2.A-14	NS3 RAV に対するグラゾプレビルの活性:一過性導入ウイルスアッセイ	30
表	2.6.2.A-15	GT1 NS3 RAV に対するグラゾプレビル及び既存の NS3/4A プロテアーゼ阻	
		害薬の阻害活性	32
表	2.6.2.A-16	GT1b NS5A に対するグラゾプレビル及び既存の NS3/4A プロテアーゼ阻害	
		薬の阻害活性	34
表	2.6.2.A-17	GT1a NS5A RAV に対するグラゾプレビル及び他の NS3/4A プロテアーゼ阻	
		<b>害薬の活性:一過性導入ウイルスアッセイ</b>	35
表	2.6.2.A-18	エルバスビル及びグラゾプレビル併用による作用: MacSynergy 解析	37
表	2.6.2.A-19	グラゾプレビル及びエルバスビルによる耐性コロニー選択(播種細胞数	
		の%):GT1a レプリコン細胞	39
表	2.6.2.A-20	グラゾプレビル及び MK-2248併用による作用: MacSynergy 解析	
表	2.6.2.A-21	グラゾプレビル及びソホスブビル併用による作用: MacSynergy 解析	40
表	2.6.2.A-22	非標的分子に対する活性(<100 μM)	42
表	2.6.2.A-23	CES1、CES2及び CatA に対するグラゾプレビルの阻害活性	43
表	2.6.2.A-24	多重感染アッセイにおけるグラゾプレビルによる HIV 感染阻害	44
表	2.6.2.A-25	各種 HIV 治療薬による HIV 複製阻害活性に対するグラゾプレビルの影響	44
表	2.6.2.A-26	各種 HIV 治療薬の臨床濃度でのグラゾプレビルの活性	45

表	2.6.2.A-27	HBV 感染 HepG2.2.15細胞におけるグラゾプレビルの活性	46
表	2.6.2.A-28	グラゾプレビルの安全性薬理試験の概要	47
表	2.6.2.B-1	HCV GT1~6レプリコンに対するエルバスビルの活性	51
表	2.6.2.B-2	HCV GT1患者由来分離株に対するエルバスビルの活性	52
表	2.6.2.B-3	GT2患者由来分離株に対するエルバスビルの活性	52
表	2.6.2.B-4	HCV GT3患者由来分離株に対するエルバスビルの活性	53
表	2.6.2.B-5	HCV GT3のサブタイプに対するエルバスビルの活性	53
表	2.6.2.B-6	GT4サブタイプに対するエルバスビルの活性	54
表	2.6.2.B-7	GT5a 患者由来分離株に対するエルバスビルの活性	55
表	2.6.2.B-8	GT6サブタイプに対するエルバスビルの活性 <sup>a</sup>	56
表	2.6.2.B-9	GT1a、GT1b、GT2a、GT2b及びGT3aレプリコン細胞での耐性コロニー選	
		択	58
表	2.6.2.B-10	GT4a、GT5a 及び GT6における耐性コロニー選択	60
表	2.6.2.B-11	GT1a、GT1b、GT2a、GT3a、GT4a、GT5a 及びGT6の耐性変異に対する エ	
		ルバスビルの活性	61
表	2.6.2.B-12	GT1a NS5A RAV に対するエルバスビルの活性:一過性導入ウイルスアッセ	
		۲	64
表	2.6.2.B-13	HCV 直接作用型抗ウイルス剤の RAV に対するエルバスビルの活性	65
表	2.6.2.B-14	GT1a NS5A RAV に対する HCV NS5A 阻害薬の活性: 一過性導入ウイルスア	
		ッセイ	66
表	2.6.2.B-15	GT1b NS5A RAV に対する HCV NS5A 阻害薬の活性	67
表	2.6.2.B-16	GT1 NS3 RAV に対する HCV NS5A 阻害薬の活性	67
表	2.6.2.B-17	エルバスビル耐性変異に対するプロテアーゼ阻害薬及びポリメラーゼ阻害	
		薬の活性	70
表	2.6.2.B-18	エルバスビル及びグラゾプレビル併用による作用: MacSynergy 解析	70
表	2.6.2.B-19	エルバスビル及びリバビリン併用による作用: MacSynergy 解析	71
表	2.6.2.B-20	エルバスビル及び MK-2248併用による作用: MacSynergy 解析	71
表	2.6.2.B-21	エルバスビル及びソホスブビル併用による作用: MacSynergy 解析	72
表	2.6.2.B-22	エルバスビル及びグラゾプレビルによる耐性コロニー選択:GT1aレプリコ	
		ン細胞	73
表	2.6.2.B-23	非標的分子に対する活性:競合的結合の標的 (IC <sub>50</sub> <10 μM)	74
表	2.6.2.B-24	非標的分子に対する活性:酵素阻害の標的 (IC50<10 μM)	74
表	2.6.2.B-25	CES1、CES2及び CatA に対するエルバスビルの阻害活性	75
表	2.6.2.B-26	細胞株を用いたエルバスビルの細胞毒性の評価	75
表	2.6.2.B-27	多重感染アッセイにおけるエルバスビルによる HIV 感染阻害	76
表	2.6.2.B-28	培養細胞における各種 HIV 治療薬の HIV 複製阻害活性に対するエルバスビ	
		ルの影響	77

# グラゾプレビル/エルバスビル

# 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

# 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.B-29		29 GT1aレプリコン細胞におけるエルバスビルの活性に対する各種 HIV 治療薬	
		の影響	78
表	2.6.2.B-30	HepG2.2.15細胞を用いた HBV 複製アッセイにおけるエルバスビルの活性	79
表	2.6.2.B-31	エルバスビルの安全性薬理試験の概要	80
表	2.6.2.B-32	エルバスビルの血漿中薬物動態パラメータ	83

# 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

# 図一覧

			貝
义	2.6.2.A-1	GT1b レプリコン細胞に対するグラゾプレビルの2週間 in vitro 活性試験	.20
义	2.6.2.A-2	グラゾプレビル及びインターフェロン α 又はリバビリンの併用による相加	
		作用	.36
図	2.6.2.A-3	GT1a レプリコン細胞でのエルバスビル及びグラゾプレビル(NS3/4A プロテ	
		アーゼ阻害薬) 併用時の耐性抑制活性:培養皿の画像	.38
义	2.6.2.B-1	GT1a レプリコンに対する HCV RNA 減少パターン	. 69

# 略号及び用語の定義

略号	定	· 義
MK-5172,	Grazoprevir	グラゾプレビル
MK-8742,	Elbasvir	エルバスビル
MK-5172A	Grazoprevir/Elbasvir combination	グラゾプレビル/エルバスビル配
	1	合錠
AUC <sub>0-24 hr</sub>	Area under the Curve from zero to 24	投与後0から24時間までのAUC(血
0.21 III	hours	漿中濃度-時間曲線下面積)
b.i.d.	Bis in die	1日2回投与
Cat A	Cathepsin A	カテプシン A
CC	Cellular cytotoxicity	細胞毒性
CES	Carboxylesterases	カルボキシルエステラーゼ
CI	Confidence interval	信頼区間
СНО	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C <sub>max</sub>	Observed maximum concentration	最高血漿中濃度
Ct	Threshold cycle number	サイクル閾値数
CTD	Common Technical Document	コモンテクニカルドキュメント
DAA	Direct-acting antiviral agents	直接作用型抗ウイルス剤
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EC <sub>50</sub>	Concentration that reduces effective	50%有効濃度
	response by 50%	
EC <sub>90</sub>	Concentration that reduces effective	90%有効濃度
	response by 90%	
ECG	Electrocardiographic	心電図
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価
GT	Genotype	遺伝子型
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試
		験の実施の基準
HBV	Hepatitis B virus	B型肝炎ウイルス
HCV	Hepatitis C virus	C型肝炎ウイルス
hERG	Human ether-à-go-go-related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HIV	Human immunodeficiency virus	ヒト免疫不全ウイルス
hNav1.5	Cardiac sodium channel	心筋細胞ナトリウムチャネル
hr	Hour	時間
IC <sub>50</sub>	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Conference on	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
	Harmonization of Technical	
	Requirements for Registration of	
	Pharmaceuticals for Human Use	
IK <sub>r</sub>	Human ether-à-go-go-related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
	(hERG) potassium channel current	(hERG) カリウムチャネル電流
IK <sub>s</sub>	Slowly activating delayed rectifier	心筋緩徐活性型遅延整流性カリウ
	cardiac potassium channel current	ムチャネル電流
kg	Kilogram	キログラム
mg	Milligram	ミリグラム
msec	Millisecond	ミリ砂
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-car	(左記参照)

# 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

# 2.6.2 薬理試験の概要文

略号	卡	議
V DH	boxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophen	4%
	yl)-2H-tetrazolium	
NHS	Normal human serum	正常ヒト血清
nM	Nanomolar	ナノモル濃度
NS	Non-structural protein	非構造蛋白質
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
pM	Picomolar	ピコモル濃度
ProSEAP	Protease-dependent secreted alkaline	(左記参照)
	phosphatase assay	
QTc	HR-Corrected QT Interval	心拍数補正 QT 間隔
RAV	Resistance-associated variants	耐性変異
RNA	Ribonucleic acid	リボ核酸
SD	Standard deviation	標準偏差
SOF	Sofosbuvir	ソホスブビル
$T_{max}$	Time to reach C <sub>max</sub>	最高血漿中濃度到達時間
TMTC	Too many to count	過多のため計測不可
TRF	Time-resolved fluorescence	時間分解蛍光
μΜ	Micromolar	マイクロモル濃度
VS.	Versus	~に対して
WT	Wild-type	野生型
w/v	Weight/volume	重量/容積
w/w	Weight/weight	重量/重量

#### 2.6.2 薬理試験の概要文

#### 2.6.2.1 要約

グラゾプレビル (別名 MK-5172、 ) は C 型肝炎ウイルス (HCV) の非構造蛋白質 (NS) 3/4A に可逆的に結合する大環状ペプチド構造の阻害薬であり、エルバスビル(別名 MK-8742、 ) は HCV の NS5A に対する低分子阻害薬である。 HCV genotype (GT) 1、GT3及び GT4慢性感染患者を対象に開発されたグラゾプレビル及びエルバスビルの併用投与や両剤の固定 用量配合錠 (別名 MK-5172A) は、高い有効性と忍容性、1日1回の容易な服薬とともにペグインターフェロンの不要な短期間療法が可能である。本邦では HCV GT1感染患者に対して、グラゾプレビル及びエルバスビルの12週間の投与レジメンが提案されている。グラゾプレビル及びエルバスビルの臨床推奨用量は、それぞれ100 mg 及び50 mg である。 MK-5172-P-058試験の HCV 感染患者でのグラゾプレビル及びエルバスビルの血漿中全身曝露量(定常状態での AUC<sub>0-24 hr</sub> の幾何平均値) はそれぞれ4.438 μM・hr 及び2.775 μM・hr であり、C<sub>max</sub> 値はそれぞれ0.617 μM 及び0.177 μM であった[2.7.2.3.1; 2.7.2.3.2項]。

HCV NS3/4A プロテアーゼ遺伝子は、HCV ポリ蛋白質を4箇所で特異的に切断するウイルス複 製に不可欠なセリンプロテアーゼをコードしている。グラゾプレビルは、in vitro の細胞を用いた 一連のアッセイにより、HCV NS3/4A に可逆的に結合する大環状ペプチド構造の阻害薬であるこ とが明かとされた[資料4.3:9]、[資料4.3:10]。グラゾプレビルは GT 1~6由来の NS3/4A 酵素に対 し、in vitro では1 nM 未満の濃度で阻害した(IC<sub>50</sub>値: 0.004~0.690 nM)。エラスターゼやトリプ シン等、他のセリンプロテアーゼに対し、グラゾプレビルには検出可能な阻害作用が認められな かった。本薬には NS3/4A プロテアーゼへの優れた選択性が認められたが、キモトリプシンに対 しては弱い阻害活性が認められた(IC<sub>50</sub>値: 1.5  $\mu$ M、約373,750倍の選択性)。レプリコンアッセイ において、グラゾプレビルは GT1a、GT1b、GT4a 及び GT6a のウイルス複製を強力に阻害し (EC50 値: それぞれ0.4、0.5、0.3及び0.9 nM)、40% 正常ヒト血清存在下でもその活性に変化は認められ なかった (EC50値: 1.1 nM)。また、本薬は完全長レプリコンの GT2a、GT2b、GT3a 及び GT5a においても阻害活性が認められ(EC50値: それぞれ2.3 nM、3.7 nM、7.6 nM 及び1.5 nM)、さらに キメラレプリコンの GT6a ( $EC_{50}$ 値: 0.9 nM) でも阻害活性が認められた。また、完全長レプリコ ンの GT3a(S52)(EC<sub>50</sub>値 : 35 nM) でのグラゾプレビルの活性は低かったが、NS3 catalytic domain を有するキメラレプリコンでの活性は低くなかった(EC50値:2.1 nM)。基準配列(reference sequence) 以外に GT1~6の複数患者のプロテアーゼ遺伝子を有するレプリコンに対しても、グラゾプレビ ルは阻害活性を示した。In vitro 耐性コロニー選択試験において、グラゾプレビルは耐性コロニー 数を濃度依存的に抑制した。このとき、ほとんどの genotype では主として56位、156位及び168位 に変異耐性(RAV)が認められた。NS5A領域及びNS5B領域で選択されたRAVはグラゾプレビ ルへの交差耐性を示さなかった。グラゾプレビルは、インターフェロン α、ソホスブビル (NS5B 阻害薬) 又はリバビリンとの in vitro 併用試験において、いずれかの薬物との相加効果を示したが、 拮抗作用は認められなかった。また、グラゾプレビル及びエルバスビル(NS5A阻害薬)の in vitro 併用試験では、検討した濃度範囲の大部分で相加作用が認められ、拮抗作用はみられず耐性発現 を強力に抑制した。



グラゾプレビルは HCV NS3/4A プロテアーゼに対して極めて選択的な薬物である。本薬の非標的分子(off-target)に対する活性については $1\,\mu$ M を上回る濃度でのみ認められ、HCV NS3/4A プロテアーゼとの選択比は $1\,X10^6$ を上回った。グラゾプレビルは培養細胞において臨床濃度ではHIV 又は HBV 複製を阻止しなかった。

グラゾプレビルは1 mg/kg 7日間投与(1 H 2回)により、GT1b 及び GT1a の HCV 慢性感染チンパンジーの血漿中 HCV RNA 量はそれぞれ4~ $5 \log$  及び約 $3.5 \log$  減少した。このとき主な耐性変異として R155K 変異がみられたが、R155K 変異ウイルスに感染したチンパンジーにおいてもグラゾプレビルは極めて有効であり、ウイルス量を約 $2 \log$  減少させた。

エルバスビルは HCV 複製に必須の蛋白質である HCV NS5A の強力かつ特異的な低分子阻害薬 である[資料4.3: 11] [資料4.3: 12]。NS5A 配列を含むサブゲノムレプリコン細胞株パネルを用いて 検討したところ、エルバスビルは HCV の全 genotype に対して強い活性を示し、それらの EC50値 は pM から nM レベルの濃度範囲にあった。GT1a 及び GT1b 臨床分離株由来の NS5A 配列をコー ドするレプリコンに対するエルバスビルの EC50値は、それぞれ3~9 pM 及び3~10 pM の範囲であ り、基準配列に対する EC50値と同程度であった。エルバスビルは既知の RAV が存在しない GT4、 GT5及び GT6患者分離株並びにサブタイプに対して同程度の活性を示した。GT3患者分離株に対 する活性は、3~330 pM (EC50値) の範囲であった。GT2の自然多型 (31M) に対するエルバスビ ルの活性はやや低く、31M 多型を含む NS5A GT2配列に対する EC50値は、3~20 nM の範囲であっ た。NS5A の28位、30位、31及び93位のアミノ酸変異に対するエルバスビルの活性は野生型レプ リコンに対するより低く、活性低下の程度は genotype により異なっていた。既知の耐性変異に対 する活性の検討に加え、レプリコンの ECoo値の複数倍濃度において de novo での濃度依存的な耐 性の抑制も認められた。エルバスビルは、他の直接作用型抗ウイルス薬(DAA)で認められる RAV に対しても抗ウイルス活性を維持しており、活性の低下はみられなかった。グラゾプレビル も他の DAA による RAV に対して抗ウイルス活性を維持しており、エルバスビルによる活性の維 持はこれをさらに補完するものである。エルバスビル及びグラゾプレビルの in vitro 併用試験では HCV リボ核酸 (RNA) の複製を相加的に阻害し、in vitro 耐性コロニー選択試験において耐性を 獲得しにくい (high genetic barrier) ことが示された。エルバスビルとリバビリン又はソホスブビ ルの in vitro 併用試験では拮抗作用が認められなかった。

エルバスビルは高い選択性を有する NS5A 阻害薬である。種々の酵素、トランスポーター、受容体及び生理活性のある蛋白質からなる非標的分子(off-target)パネルを用いた in vitro 試験より、本薬の非標的分子に対する活性は GT1レプリコンにおける  $EC_{90}$ 値の100,000倍以上の濃度でのみ認められた。培養細胞においてエルバスビルは臨床濃度でHIV又はHBV複製を阻害しなかった。また、エルバスビルは $25~\mu M$  の濃度で細胞毒性を示さなかった。したがって、本薬の GT1a における活性と比較した治療指数は $1~X~10^6$ を上回った。

動物モデルでのエルバスビルの薬理活性の検討は行わなかった。

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) S7A 及び S7B ガイドラインに準拠した in vitro 及び in



- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

vivo の安全性薬理試験を実施し、グラゾプレビル及びエルバスビル単独での心血管系、呼吸系及び中枢神経系への影響を検討した。さらに、追加の探索的スクリーニング試験により、ラット及びイヌでのエルバスビルの血清生化学的プロファイルを評価し、ラットの主要臓器・組織(グラゾプレビルでは肝臓、エルバスビルでは肝臓、腎臓、骨格筋及び心臓)における種々の生理学的及び病理学的機能に関わるパスウェイでの遺伝子発現の変化を評価した。これらの試験においてグラゾプレビル及びエルバスビルによる懸念される作用は認められなかった。

以上の非臨床プロファイルより、慢性 HCV 感染治療におけるグラゾプレビル (100 mg) 及びエルバスビル (50 mg) の併用投与並びに両剤の併用投与や固定用量配合錠での安全な使用が裏付けられた。

本文書の前半はグラゾプレビルに関するセクション(A と表示)とし、コモンテクニカルドキュメント(CTD)の配列順に並べて記載した。次に、エルバスビルに関するセクション(B と表示)を CTD の配列順に記載した。考察及び結論では、両化合物に関して統合された考察を述べた。

グラゾプレビル及びエルバスビルの非臨床薬理試験及び安全性薬理試験の一覧を、それぞれの薬理試験概要表[2.6.3.A.1項及び2.6.3.B.1項]に示した。

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.A セクション A: グラゾプレビル

2.6.2.A.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.A.2.1 In Vitro 試験

2.6.2.A.2.1.1 阻害活性

[資料4.2.1.1.6: MK-5172 PD006][資料4.2.1.1.1: MK-5172 PD001][資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

[資料4.2.1.1: MK-5172 PD003]

#### 2.6.2.A.2.1.1.1 HCV NS3/4A プロテアーゼに対する阻害活性

グラゾプレビルは、広範な genotype に対して活性を示す強力な NS3/4A プロテアーゼ阻害薬である[表 2.6.2.A-1]。本薬の酵素阻害活性を時間分解蛍光(Time-resolved fluorescence: TRF)法により算出した。この方法は基質ペプチドの加水分解を測定するものであり、種々HCV genotype 配列の精製完全長 NS3/4A による切断を TRF の上昇として捕捉している。本試験でみられたグラゾプレビルによる活性の  $IC_{50}$ 値は、いずれの genotype においても nM レベルを下回った[表 2.6.2.A-1

種々の genotype でのグラゾプレビルの in vitro 酵素阻害活性]。GT1での活性は数 pM であり、GT1以外での活性は $0.034\sim0.135$  nM の範囲であるが、例外として GT3a における IC $_{50}$ 値は0.690 nM であった[資料4.2.1.1.6: MK-5172 PD006] [2.6.3.A.1項]。

表 2.6.2.A-1 種々の genotype でのグラゾプレビルの in vitro 酵素阻害活性

酵素	$IC_{50} \pm SD (nM)$
1a	$0.007 \pm 0.001$
1b	$0.004 \pm 0.001$
2a	$0.067 \pm 0.024$
2b	$0.135 \pm 0.051$
3a	$0.690 \pm 0.194$
4a	$0.062 \pm 0.031$
5a	$0.067 \pm 0.022$
6a	$0.034 \pm 0.007$
キモトリプシン (選択性)	1495(373,750倍)

SD=標準偏差

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.6: MK-5172 PD006]

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

次に、細胞レベルでの NS3蛋白質の活性を調べるため、DNA 導入による ProSEAP 表現型アッセイを実施した。このアッセイは細胞から分泌されるレポーター遺伝子産物(分泌型アルカリフォスファターゼ)の生成を介してプロテアーゼに対する活性を測定するものである。グラゾプレビルの添加により分泌型レポーター蛋白量は減少した。 $GT1\sim6$ 由来の NS3パネルでの活性は様々であった。GT2及び GT3プロテアーゼはグラゾプレビルによるプロテアーゼ阻害に対する感受性が低かった[表 2.6.2.A-2] [資料4.2.1.1.1: MK-5172 PD001][2.6.3.A.1項]。

表 2.6.2.A-2 ProSEAP 表現型アッセイにおける NS3/4A genotype パネルに対する グラゾプレビルの in vitro 活性

Genotype	$EC_{50} \pm SD (nM)$
GT1a (H77)	$2.3 \pm 1.4$
GT1b (con1)	$1.2 \pm 0.8$
GT2a (JFH)	$47.4 \pm 35.2$
GT2b (J8)	$112 \pm 68.9$
GT3a (33771)	$363 \pm 292$
GT4a (24675)	$1.2 \pm 0.6$
GT6a (24485)	$3.0 \pm 0.1$

SD=標準偏差

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.1: MK-5172 PD001]

HCV 感染患者の血漿から分離された GT1a 配列のパネルを用いたグラゾプレビルの活性は、0.4 ~5.1 nM の範囲(約13倍:  $EC_{50}$ 値)であった。GT1b 患者分離株での  $EC_{50}$ 値は0.2 ~5.9 nM の範囲(約30倍)であった。データを[表 2.6.2.A-3]に示す[資料4.2.1.1.1: MK-5172 PD001] [2.6.3.A.1項]。

表 2.6.2.A-3 ProSEAP 表現型アッセイにおける GT1a 及び GT1b 臨床分離株に対する グラゾプレビルの活性

GT1a 患者分離株	$EC_{50} \pm SD (nM)$
GT1a (H77)	$2.3 \pm 1.4$
ps25	$0.7 \pm 0.2$
ps26	$0.6 \pm 0.3$
ps27	$0.7 \pm 0.4$
ps28	$0.4 \pm 0.3$
ps29	$0.4 \pm 0.3$
ps35	$5.1 \pm 1.3$
ps36	$1.1 \pm 0.4$
ps38	$2.8 \pm 0.7$
ps40	$0.8 \pm 0.1$
ps41	$1.4 \pm 0.2$
GT1b 患者分離株	$EC_{50} \pm SD (nM)$
GT1b_con1	$1.2 \pm 0.8$
ps19	$0.2 \pm 1$
ps20	$1.8 \pm 0.2$
ps30	$5.9 \pm 1.4$
ps31	$0.3 \pm 0.1$
ps32	$0.6 \pm 0.3$
ps33	$4.9 \pm 0.4$
ps34	$0.3 \pm 0.2$
ps42	$0.2 \pm 0.1$
ps43	$0.2 \pm 0.1$

SD=標準偏差

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.1: MK-5172 PD001]

#### 2.6.2.A.2.1.1.2 HCV レプリコンを用いた複製阻害活性

グラゾプレビルの活性を、いくつかの臨床分離株由来の HCV レプリコンを用い、TaqMan アッセイにより評価した。その結果、GT1a 及び GT1b レプリコン細胞株におけるグラゾプレビルの  $EC_{50}$ 値はそれぞれ0.4 nM 及び0.5 nM であった。相同 GT2a レプリコン( $EC_{50}$ 値:2.3 nM) 及び NS3/4A をコードする GT2b 由来のキメラレプリコン ( $EC_{50}$ 値 $2.9\sim3.7$  nM) では、活性のわずかな低下が認められた。40%正常ヒト血清存在下での活性変化は3倍未満であった( $EC_{50}$ 値:1.1 nM) [資料 4.2.1.1.5: MK-5172 PD005][表 2.6.2.A-4]。

車 262A4	GT 1 及び GT2	レプロコンルが	オスガニゾプ	レビルの活性 a
オマ Z.D.Z.A-4		レノリコンにめ	りるソフソノ	レヒルの活件

レプリコン	$EC_{50} \pm SD (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
GT1a H77	$0.4 \pm 0.3$	$0.9 \pm 0.5$
GT1b con1	$0.5 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.6$
GT2a JFH	$2.3 \pm 1.2$	$7.1 \pm 3.1$
GT2b (AY232740*)	$3.7 \pm 1.1$	$7.8 \pm 2.1$
GT2b (AY232732*)	$2.9 \pm 0.4$	$6.8 \pm 1.6$
GT1b (40% NHS)	$1.1 \pm 0.4$	$3.1 \pm 0.7$

a TaqMan アッセイでの測定。

SD=標準偏差、NHS=正常ヒト血清

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

GT3a NS3/4A 標準株及び患者分離株に対するグラゾプレビルの活性は、そのほとんどが nM レベルと推定された。キメラ GT3a(GLA)レプリコンに対する活性(EC $_{50}$ 値:7.6 nM)は、酵素阻害作用のデータと一致して GT1a よりも低かった。完全長 GT3a(S52)レプリコンではより顕著に活性低下(EC $_{50}$ 値:35 nM)がみられた。S52プロテアーゼドメインを GT2a(JFH-1)の遺伝的背景に置き換えた場合、グラゾプレビルの活性(EC $_{50}$ 値:2.1 nM)が他のキメラレプリコンに対する活性と同程度であったことから、この活性低下には近傍の GT3(S52)配列による影響が示唆された[表 2.6.2.A-5]。

表 2.6.2.A-5 GT 3 レプリコンに対するグラゾプレビルの活性 <sup>a</sup>

レプリコン	$EC_{50} \pm SD (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
GT3a (NS3/4A GLA**):2a*	$7.6 \pm 3.2$	$20.5 \pm 9.0$
GT3a S52 full-length GU814264	$35.0 \pm 15$	$153 \pm 35$
GT3a (S52)*	$2.1 \pm 1$	$10.2 \pm 1$
GT3a (GQ356213)*	$5.6 \pm 3$	$12.8 \pm 2$
GT3a (HQ738645)*	$6.8 \pm 4$	$19.9 \pm 3$
GT3a (HQ912953)*	$3.4 \pm 1$	$13.4 \pm 3$
GT3a (AY956467)*	$6.1 \pm 5$	$17.7 \pm 2$

a TaqMan アッセイでの測定。

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

<sup>\*</sup> GenBank アクセッション番号。キメラレプリコンは GT2a\_JFH1株から作製した。

<sup>\*</sup> GenBank アクセッション番号。レプリコンは GT2a JFH1株から作製した。

<sup>\*\*</sup> 社内の命名。NS3 GenBank アクセッション番号 GU045445.1; NS4A GenBank アクセッション番号 GU945457.1。SD=標準偏差

多数の GT4サブタイプが公開データベースに登録されている。キメラレプリコンを用いて検討した GT4分離株に対するグラゾプレビルによる阻害の程度は、GT1及び GT4a (ED43) 完全長基準配列のそれと同程度であり、グラゾプレビルは GT4由来の臨床分離株に対して広く活性を有することが示された。データを[表 2.6.2.A-6]に示す。

表 2.6.2.A-6 GT 4 レプリコンに対するグラゾプレビルの活性<sup>®</sup>

レプリコン	$EC_{50} \pm SD (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
GT4a ED43 full-length GU814266*	$0.3 \pm 0.2$	$0.8 \pm 0.4$
GT4b (FJ025854)*	$0.2 \pm 0.04$	$0.3 \pm 0.05$
GT4b (FJ0025855)*	$0.11 \pm 0.04$	$0.32 \pm 0.13$
GT4g (JX227963)*	$0.15 \pm 0.09$	$0.71 \pm 0.78$
GT4g (JX227971)*	$0.33 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.16$

a TaqMan アッセイでの測定。

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

GT5配列は公開データベースにはわずかしか登録されておらず、その大部分が GT5a である。GT5a プロテアーゼ配列を含むサブゲノムレプリコンに対するグラゾプレビルの活性は、nM レベルもしくはそれより低い値であった。特に、GT5a GU945429配列では V168、また、ZADGM1104 配列では E168であり、通常これらの変異はグラゾプレビルの活性低下に関与しているが、その他に検討した GT5a では通常の D168であった。GU945429及び ZADGM1104に対するグラゾプレビルの活性は、参照とした SA13 (AF064490) に対する活性のそれぞれ約1/4及び1/2であった。データを[表 2.6.2.A-7]に示す。

表 2.6.2.A-7 GT 5 レプリコンに対するグラゾプレビルの活性 <sup>8</sup>

レプリコン	$EC_{50} \pm SD (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
GT5a (AF 064490)*	$1.5 \pm 1.2$	$4.5 \pm 3.2$
GT5a (GU 945429)*	$6.6 \pm 0.6$	$12.8 \pm 2.2$
GT5a (ZADGM0518)*	$0.6 \pm 0.2$	$1.4 \pm 0.3$
GT5a (ZADGM1104)*	$3.2 \pm 0.9$	$8.0 \pm 1.6$
GT5a (ZADGM2582)*	$0.4 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.3$

a TaqMan アッセイでの測定。

[2.6.3.A.1項][資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

<sup>\*</sup> GenBank アクセッション番号。患者分離株を含むキメラレプリコンは GT2a\_JFH1株から作製した。SD=標準偏差

<sup>\*</sup> GenBank アクセッション番号。患者分離株を含むこのレプリコンは GT2a\_JFH1株から作製した。 SD=標準偏差

GT6レプリコンについては、検討したすべてのサブタイプでは NS3配列に対するグラゾプレビルの  $EC_{50}$ 値は nM レベルを下回っており、このことは GT6臨床分離株に対するグラゾプレビルの広い有効性を示唆するものである。GT6サブタイプのデータを[表 2.6.2.A-8]に示す。

表 2.6.2.A-8 GT 6 レプリコンに対するグラゾプレビルの活性<sup>a</sup>

レプリコン	$EC_{50} \pm SD (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
GT6a (NS3/4 <sup>a</sup> JN 180455.1*):1b (N)	$0.9 \pm 0.1$	$2.3 \pm 0.4$
GT6 (DQ278892)*	$0.2 \pm 0.04$	$0.3 \pm 0.1$
GT6e (EU246931)*	$0.3 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.3$
GT6m (DQ835763)*	$0.1 \pm 0.05$	$0.5 \pm 0.3$
GT6n (DQ835768)*	$0.3 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.3$
GT6t (EF632071)*	$0.3 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.3$
GT6u (EU408331)*	$0.2 \pm 0.2$	$0.7 \pm 0.6$
GT6v (EU798760)*	$0.1 \pm 0.04$	$0.3 \pm 0.1$
GT6w (EU643836)*	$0.1 \pm 0.04$	$0.2 \pm 0.04$

a TaqMan アッセイでの測定。

SD=標準偏差

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

上記の  $EC_{50}$ 値より、グラゾプレビルは HCV 臨床分離株に対して広く活性を有することが示唆された。

他の DAA 由来 RAV のパネルを用いてグラゾプレビルの活性を検討した。複数の genotype の NS5A 及び NS5B RAV に対するグラゾプレビルの交差耐性は認められなかった[表 2.6.2.A-9]。

<sup>\*</sup> GenBank アクセッション番号。患者分離株を含むレプリコンは GT2a\_JFH1株から作製した。ただし、JN180455.1 (GT1b) は除く。

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.A-9 NS5A 及び NS5B 変異パネルに対するグラゾプレビルの活性

Genotype	阻害薬の クラス	変異	$EC_{50} \pm SD (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$		
		WT	$0.4 \pm 0.3$	$0.9 \pm 0.5$		
		Q30D	$0.6 \pm 0.2$	$1.6 \pm 0.4$		
		Q30R	$0.3 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.4$		
	NS5A	L31M $0.1 \pm 0.1$		$0.5 \pm 0.2$		
	NSSA	Y93H	$0.5 \pm 0.2$	$3.5 \pm 1.3$		
GT1a		Y93N	$0.6 \pm 0.2$	$2.0 \pm 0.7$		
		L31M_Y93H	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$			
		L31M_Y93C	$0.64 \pm 0.3$	$1.5 \pm 0.5$		
		C316Y	$0.4 \pm 0.3$	$1.9 \pm 1.0$		
	NS5B	M414I	$0.5 \pm 0.2$	$1.5 \pm 0.6$		
		M423T	$0.3 \pm 0.2$	$1.0 \pm 0.5$		
		WT	$0.5 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.6$		
		L31M	$0.2 \pm 0.004$	$0.7 \pm 0.1$		
	NS5A	L31V				
GT1b	110371		$0.8 \pm 0.6$			
GIIU				$0.3 \pm 0.02$		
		L31M_Y93H				
	NS5B					
	110315					
GT2a	NS5A					
G12u	110371					
GT2b <sup>a</sup>	NS5A					
G120	110371					
GT3a S52	NS5A					
GT3i JX227955 <sup>a</sup>						
GT3g JF735123 <sup>a</sup>		WT	$3.3 \pm 1$	$8.7 \pm 2.4$		
GT5a AF064490 <sup>a</sup>	NS5A	WT	$1.0 \pm 0.8$	$2.3 \pm 2.0$		
3134711 004490	110371	L31C	$0.8 \pm 0.3$	$3.0 \pm 2.4$		

a キメラレプリコンは JFH1株の NS5A 配列を含む。

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

SD=標準偏差、WT=野生型

レプリコンを含有する Huh-7細胞及び HeLa 細胞を用いて、細胞毒性を評価した。いずれの場合も、 $CC_{50}$ 値は25  $\mu$ M を上回った[表 2.6.2.A-10] [資料4.2.1.1: MK-5172 PD003] [2.6.3.A.1項]。

表 2.6.2.A-10 細胞培養におけるグラゾプレビルの細胞毒性

細胞株	CC <sub>50</sub> , μM
Huh-7 GT1b レプリコン	68.9
含有細胞	
HeLa	70.4

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1: MK-5172 PD003]

GT1b レプリコン細胞(HB1細胞)を用い、グラゾプレビルの2、4、10 nM 又はジメチルスルホキシド(DMSO)を対照とした G418(ジェネティシン)非存在下での2週間の活性評価を行った [図 2.6.2.A-1]。その後、グラゾプレビル非存在下及び G418存在下でレプリコン細胞をさらに1週間培養し、レプリコン RNA 量の回復を評価した。

最初の2週間では、グラゾプレビルの濃度に依存してレプリコン RNA 量が減少した[図 2.6.2.A-1]。試験開始後の約1.5週で減少は緩徐となり、グラゾプレビル低濃度の2群では、レプリコン RNA 量の減少が見かけ上プラトーとなった。この時点での減少も濃度依存的であった。2週後、G418存在下・グラゾプレビル非存在下の培地に交換した。グラゾプレビル処置群では見かけ上の細胞増殖はほとんどみられず、レプリコン RNA 量の回復は限定的であった。DMSO 対照群では G418再添加後の増殖阻害は認められず、レプリコン RNA 量は試験全体を通じて一定であった。培養第開始時又は第2週のいずれかの時点で分離されたレプリコン RNA 由来 NS3/4A の集団配列解析の結果、いずれにおいても耐性出現は認められなかった。以上、グラゾプレビルの継続処理により、抗ウイルス作用の維持が示唆された。

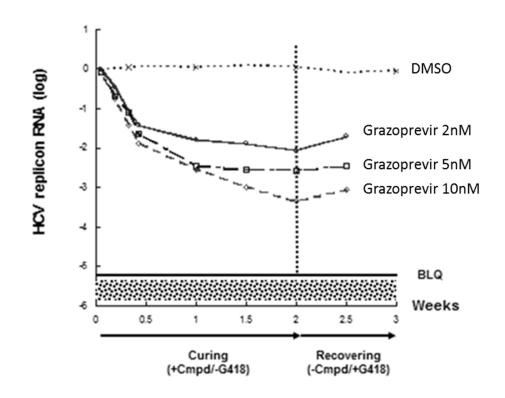


図 2.6.2.A-1 GT1b レプリコン細胞に対するグラゾプレビルの 2 週間 in vitro 活性試験

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

方法:GT1b レプリコン細胞(HB1細胞)をグラゾプレビル2、5、10 nM 又は薬物を含まない DMSO 対照存在下で2週間インキュベートした後、3週目に G418(0.5 mg/mL)存在下及びグラゾプレビル非存在下でインキュベートした。表示した時点で細胞を採取し、qRT-PCR 法によりレプリコン RNA 量を測定した。

#### 2.6.2.A.2.1.2 耐性型分析

[資料4.2.1.1.2: MK-5172 PD002] [資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005][資料4.2.1.1.13: MK-5172A PD016]

#### 2.6.2.A.2.1.2.1 De novo 耐性変異選択試験

GT 1~6の NS3プロテアーゼを含むレプリコンを用いて、グラゾプレビルによる耐性コロニー選択を行い、重要な変異を同定した[資料4.2.1.1.2: MK-5172 PD002] [2.6.3.A.1項]。GT1b(Con1)レプリコンを用いた初回の試験では、濃度6 nM(EC $_{50}$ 値の10倍)のグラゾプレビルによる選択で26コロニーが得られたが、30 nM(EC $_{50}$ 値の50倍)の濃度で単離されたのは6コロニーのみであった。16コロニーについて十分な配列データが得られた。これらコロニーのうち3つは二重変異をコードしており、高い選択圧が示唆された。2つはアミノ酸残基156位及び168位の両方の突然変異をコードし、1つはアミノ酸残基の41位及び156位の突然変異をコードしていた。NS3領域内の突然変異をコードしていないコロニーが1つあった。コロニー選択の結果を[表 2.6.2.A-11]に示す。

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.A-11 グラゾプレビルの GT1b Con1 レプリコンでの耐性コロニー選択

グラゾプレビル (nM)	F43 コロニー 番号	A156 コロニー 番号	D168 コロニー 番号	Q41: A156 コロニー 番号	A156: D168 コロニー 番号	突然変異なし
6	1S	1T 2S	1A 1V 1G	0	1 156V, 168V 1 156S, 168A	0
30	1S, 2F/S	1T 1T/S/A	0	1 Q41H, A156V	0	1

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.2: MK-5172 PD002]

方法: 100,000個の HB1細胞(GT1b)を T162 Z-top フラスコ内に播種し、 $0.5 \, \mathrm{mg/mL}$  の G418及び所定濃度のグラ ゾプレビルとともに培養した。選択開始の約15日後にグラゾプレビル及び抗生物質への耐性を示す細胞の小コロニーが可視化されたため、それらを単離した。薬物耐性細胞クローン内に存在する HCV レプリコンの配列は、耐性細胞クローン由来のレプリコン RNA 抽出、逆転写酵素 PCR 及び PCR 産物の直接配列決定法により得た。

さらに、GT1a、GT2a、GT3a、GT4a、GT5a及びGT6aレプリコンについても検討した[表 2.6.2.A-12]。 選択は、各  $EC_{50}$ 値の約2.5倍、5倍、10倍及び25倍の濃度で実施した(GT4a のみ  $EC_{50}$ 値の1倍、3 倍、10倍及び30倍)。それぞれの選択時にコロニーをプールし、集団配列解析をおこなった。

表 2.6.2.A-12 グラゾプレビルの GT1a、GT2a、GT3a、GT4a、GT5a 及び GT6a レプリコンでの 耐性コロニー選択

Genotype	グラゾプレビル (nM)	EC <sub>50</sub> 値の 倍数	変異(出現%)
GT1a	薬物なし	0	Q41R (10)
	2.5	2.5	Q41R (50); D168E ( 35)
	5.0	5	A39V (100); Q41R (90); D168V (90)
	10.0	10	I48A (40); D168A (30); D168G (30); D168V (40)
GT2a	12.5	2.5	Q41R (10); Y56H (5)
	25	5	Q41R (5); Y56H (5); A156V (5)
	50	10	T27I (10); Y56H (90); A156V (5), D168E (50)
	125	25	V71A (50); A156V (30); A156T (80); L175F (10)
GT3a	62.5	2.5	Q168R (80); Q178R (5)
	125	5	V163I (5); Q168R (100)
	250	10	N77S (5); Q168R (100)

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.A-12 グラゾプレビルの GT1a、GT2a、GT3a、GT4a、GT5a 及び GT6a レプリコンでの 耐性コロニー選択(続き)

Genotype	グラゾプレビル (nM)	EC <sub>50</sub> 値の 倍数	変異(出現%)
GT4a	薬物なし	0	A61T (100%); G90R (5%)
	1.1	1	A61T (100%); G90R (5%)
	3.3	3	A61T (100%) G90R (5%); G162R (5%)
	11	10	A61T (70%): G90R (5%); D168V (30%);
			D168G (30%)
	33	30	A61T (95%); G90R (5%); D168V (50%);
			D168A (50%)
GT5a	薬物なし	0	no changes
	3.75	2.5	D168N (10%)
	7.5	5	D168N (70%); D168A (5%)
	15	10	D168N (50%): D168A (10%); D168V (10%)
	37.5	25	D168N (5%); D168A (90%); D168V (10%)
GT6a	薬物なし	0	S37T (60%); V158I (5%)
	2.5	2.5	S37T (90%); V158I (5%)
	5.0	5	S37T (70%); V158I 10%)
	10.0	10	S37T (5%); Y56H (40%); V158I (5%); D168E (5%);
	25.0	25	S37T (60%): Y56H (70%); V158I (40%);
			D168H (50%); E176G (30%)

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.2: MK-5172 PD002]

方法:GT1a、GT2a、GT3a、GT4a、GT5a 又は GT6a レプリコンを有するレプリコン細胞を6 cm 組織培養皿に $2 \times 10^5$ /cm²の密度で播種し、0.5 mg/mL の G418及び所定濃度のグラゾプレビル存在下で培養した。細胞をコンフルエントに到達するまで1/10継代し、その間、薬物を週2回補充した。個々のコロニーが過剰増殖又はコンフルエントに達したとき、細胞集団を回収した。レプリコン RNA を分離し、NS3/4A 遺伝子の配列決定のためのテンプレートとして使用した。

GT1a レプリコン選択では、すべての濃度で D168での変異がみられ、高濃度では活性を大幅に低下させる D168V 又は D168A の変異が認められた。選択時に複数回 Q41R が出現したが、薬物の非存在下でもみられたことから、少なくとも in vitro においては、その存在が複製に不利ではないことが示唆された。GT1a Q41R レプリコンでの活性低下は1/3未満であった。A39V での変異によるグラゾプレビルの活性低下は認められなかった。I48A レプリコンは確立できなかったため、評価不能であった。

GT2a 選択時に最も高頻度にみられた変異は Y56H 及び A156T/V であった。T27I、Q41R 及び L175F も認められた。GT3a 選択時では、すべての薬物濃度で Q168R がみられた。この変異は、GT3a 患者を対象としたグラゾプレビルの臨床試験でも観察されており、in vitro において Q168R はグラゾプレビルの活性を約4分の1に低下させた。N77S、V163I 及び Q178R ではさらなる変異が 認められた。

GT4a 選択については、グラゾプレビルの高濃度で D168での変異が認められた。D168G 及び D168V は11 nM のグラゾプレビル濃度 (EC $_{50}$ 値の10倍) で出現したが、D168V 及び D168A は33 nM (EC $_{50}$ 値の30倍) で出現した。低濃度では、D168の変異は認められなかった。A61T 及び G90R は DMSO 対照処置時を含む多くの選択で出現した(特に A61T が多く出現)。G162R は、ある低濃度でのグラゾプレビル存在下で少数認められた。この変異はグラゾプレビルの活性低下を生じなかったが、レプリコンのフィットネスを増加させた。G162R 適応突然変異を用いて、D168A 及び D168V 変異株を確立して検討したところ、この変異に対するグラゾプレビルの活性(EC $_{50}$ 値)はそれぞれ1/320及び1/110に低下した。

D168での変異は、GT5a 選択時、GT6a 選択時ともに高頻度で出現した。GT5a 選択では、D168N が最低濃度の3.75 nM で出現し、7.5 nM 及び15 nM の選択時でより多く認められた。D168A は 7.5 nM の選択で初めて出現がみられ、最高濃度の37.5 nM で多く認められた。D168V は高濃度でも認められた。GT5a の D168A、D168N 及び D168V の単一変異によりグラゾプレビルの活性はそれぞれ1/63、1/2.9及び1/16.9に低下した。GT6a 選択では、Y56H 及び D168E の変異が中濃度である10 nM で検出されたが、25 nM では Y56H 及び D168H が出現した。

S37T 及び V158I の変異も、薬物のない対照条件下を含むすべての薬物濃度で出現し、S37T 及び V158I は、グラゾプレビルによる選択ではなく、ある種の細胞培養時にみられる現象 (cell-culture phenomena) により誘発されることが示唆された。 さらに、E176G が最高濃度で出現したが、これは、GT1レプリコンでみられる細胞培養の適応変異として知られており、GT6に対するグラゾプレビルの活性低下はみられなかった。 Y56H 変異は E176G の存在下及び非存在下で、GT6に対するグラゾプレビルの活性をそれぞれ1/1.9及び1/76に低下させた。 D168E 及び D168H 変異は E176G 適応変異のみで確立され、グラゾプレビルの活性(EC50)はそれぞれ1/103及び1/225に低下した。

以上、グラゾプレビルの耐性コロニー選択試験において、検討したすべての genotype でアミノ酸の168位における変異が誘発された。Y56H及び A156T/V の変異は2種以上の genotype の選択で出現しており、GT1感染患者を対象とした臨床試験でも報告されている。グラゾプレビルの臨床適用時には、これらのアミノ酸位での変異について注意が必要である。

#### 2.6.2.A.2.1.2.2 NS3/4A 耐性変異(RAV)に対する活性変化:レプリコンアッセイ

De novo 耐性選択に加えて、プロテアーゼ阻害薬の前臨床又は臨床試験で報告された変異をコードするように遺伝子を改変した GT1a、GT1b、GT3a、GT4a 又は GT5a レプリコン細胞株のパネルを用い、グラゾプレビルの活性を更に検討した。すべての genotype に対する RAV データの要約を[表 2.6.2.A-13]に示す。



表 2.6.2.A-13 野生型及び変異型レプリコンに対するグラゾプレビルの活性: HCV レプリコンアッセイ\*

Genotype/変異	$EC_{50} \pm SD (nM)$	EC <sub>50</sub> の倍率 変化 (野生型との	$EC_{90} \pm SD (nM)$	EC <sub>90</sub> の倍率 変化 (野生型との
		比較)		比較)
GT1a WT (H77)	$0.4 \pm 0.2$	1.0	$0.9 \pm 0.5$	1.0
GT1a V36A	$0.5 \pm 0.3$	1.5	$1.1 \pm 0.5$	1.2
GT1a V36I	$0.4 \pm 0.2$	1.0	$0.7 \pm 0.4$	0.8
GT1a V36L	$0.5 \pm 0.3$	1.4	$1.2 \pm 0.6$	1.3
GT1a V36M	$0.3 \pm 0.2$	1.0	$0.9 \pm 0.3$	0.9
GT1a A39V	$0.1 \pm 0.03$	0.3	$0.3 \pm 0.1$	0.3
GT1a Q41R	$0.8 \pm 0.2$	2.2	$1.9 \pm 0.3$	2.1
GT1a F43L	$0.7 \pm 0.1$	1.9	$2.9 \pm 0.6$	3.1
GT1a T54A	$0.3 \pm 0.1$	0.7	$0.5 \pm 0.3$	0.6
GT1a T54S	$0.3 \pm 0.2$	0.9	$1.0 \pm 0.7$	1.1
GT1a V55A	$0.5 \pm 0.3$	1.4	$0.9 \pm 0.4$	0.9
GT1a V55I	$0.2 \pm 0.1$	0.6	$0.6 \pm 0.1$	0.6
GT1a Y56H	$5.7 \pm 4.3$	16.1	$42.6 \pm 26.4$	46.0
GT1a Q80K	$0.3 \pm 0.3$	0.9	$1.0 \pm 0.6$	1.1
GT1a Q80R	$0.4 \pm 0.2$	1.1	$1.7 \pm 0.7$	1.8
GT1a V107I	$0.2 \pm 0.1$	0.7	$0.7 \pm 0.4$	0.7
GT1a P146S	$0.8 \pm 1.2$	2.4	$1.1 \pm 0.3$	1.2
GT1a R155K	$1.3 \pm 0.7$	3.7	$2.8 \pm 2.2$	3.0
GT1a R155T	$3.4 \pm 1.7$	9.7	$7.1 \pm 2.5$	7.7
GT1a A156G	$1.7 \pm 0.1$	4.8	$4.1 \pm 0.9$	4.4
GT1a A156L	918*	2295	1820*	2022
GT1a A156S	$0.9 \pm 0.4$	2.5	$2.3 \pm 0.8$	2.5
GT1a V158I	0.1*	0.3	0.4*	0.4
GT1a D168A	$28.6 \pm 13.0$	80.7	$105.8 \pm 80.5$	114.2
GT1a D168E	$4.9 \pm 4.2$	13.9	$11.6 \pm 5.1$	12.5
GT1a D168F	$8.4 \pm 4.8$	21.0	$30 \pm 15$	33.3
GT1a D168G	$9.6 \pm 6.9$	27.2	$46.4 \pm 34.1$	50.1
GT1a D168H	$4.9 \pm 2.7$	12.3	18 ± 8	20.0
GT1a D168I	$14.3 \pm 5.2$	40.5	$68.5 \pm 8.3$	74.0
GT1a D168K	$75.1 \pm 32.1$	212.2	$280.7 \pm 18.5$	303.1
GT1a D168L	$4.3 \pm 2.4$	10.8	$18 \pm 10$	20.0
GT1a D168N	$0.9 \pm 0.4$	2.5	$2.7 \pm 1.1$	2.9
GT1a D168S	$0.7 \pm 0.3$	2.3	$6.4 \pm 4.8$	7.6
GT1a D168T	$34.7 \pm 8.0$	97.9	$85.9 \pm 22.8$	92.7
GT1a D168V	$10.5 \pm 5.0$	29.7	$54.5 \pm 40.3$	58.8
GT1a D168Y	$6.9 \pm 5.2$	21	$24 \pm 16$	27

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.A-13 野生型及び変異型レプリコンに対するグラゾプレビルの活性: HCV レプリコンアッセイ\* (続き)

Genotype/変異	$EC_{50} \pm SD (nM)$	EC <sub>50</sub> の倍率 変化 (野生型との 比較)	$EC_{90} \pm SD (nM)$	EC <sub>90</sub> の倍率 変化 (野生型との 比較)
GT1a I170T	$0.7 \pm 0.3$	2.0	$1.8 \pm 1.0$	2.0
GT1a I170V	0.1*	0.3	0.4*	0.4
GT1a V36L Q80K	$0.5 \pm 0.2$	1.4	$2.6 \pm 1.4$	2.8
GT1a V36L Q80K R155S	$14.2 \pm 9.4$	40.1	$62.2 \pm 35.6$	67.1
GT1a V36M R155K	$3.5 \pm 2.4$	9.9	$10.1 \pm 4.8$	10.9
GT1a V36M A156T	$151 \pm 20$	481.0	$480 \pm 82$	573.0
GT1a T54S R155K	$2.0 \pm 1.0$	5.7	$5.4 \pm 2.0$	5.8
GT1a Y56H D168N	$19.3 \pm 15.2$	61.4	$53.2 \pm 30.8$	63.3
GT1a R155K D168N	$2.7 \pm 1.4$	7.6	$7.5 \pm 3.4$	8.1
GT1a R155T D168N	$4.1 \pm 0.8$	11.7	$10.6 \pm 1.9$	11.4
GT1a V36M V107I R155K	$3.8 \pm 2.5$	10.6	$8.0 \pm 2.8$	8.6
GT1a WT (Huh 7.5)	$0.14 \pm 0.07$	1.0	$0.4 \pm 0.3$	1.0
GT1a Y56H D168A	$655 \pm 437$	4679	2160*	5400
GT1a Y56H A156T D168N	2420*	17000	>5000	>12500
GT1a A156T D168N	1250*	8929	2870*	7175
GT1a NS3 Q41R_NS5A M28K	$0.5 \pm 0.1$	1.5	$2.4 \pm 1.3$	2.9
GT1a NS3 Q41R_NS5A M28T	$0.5 \pm 0.1$	1.6	$1.3 \pm 0.4$	1.6
GT1b WT (Con1)	$0.5 \pm 0.3$	1.0	$1.0 \pm 0.6$	1.0
GT1b V36A	$1.0 \pm 0.4$	2.0	$2.2 \pm 0.6$	2.4
GT1b V36I	$0.2 \pm 0.1$	0.4	$0.6 \pm 0.3$	0.6
GT1b V36L	$0.5 \pm 0.2$	0.9	$1.6 \pm 0.6$	1.7
GT1b V36M	$0.9 \pm 0.6$	1.7	$1.8 \pm 1.1$	2.0
GT1b Q41L	$0.1 \pm 0.05$	0.2	$0.3 \pm 0.1$	0.3
GT1b Q41R	$1.1 \pm 0.2$	2.2	$2.2 \pm 0.7$	2.3
GT1b F43S	$1.3 \pm 1.4$	2.6	$4.7 \pm 5.3$	5.0
GT1b T54A	$0.6 \pm 0.2$	1.2	$1.6 \pm 0.6$	1.7
GT1b T54C	$0.8 \pm 0.3$	1.6	$1.6 \pm 0.6$	1.7
GT1b T54G	$0.8 \pm 0.4$	1.7	$2.1 \pm 0.6$	2.2
GT1b T54S	$0.6 \pm 0.3$	1.2	$2.0 \pm 1.2$	2.1
GT1b V55A	$0.7 \pm 0.2$	1.4	$1.4 \pm 0.4$	1.5
GT1b V55I	$0.7 \pm 0.3$	1.5	$1.8 \pm 0.8$	2.0
				1

#### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.A-13 野生型及び変異型レプリコンに対するグラゾプレビルの活性: HCV レプリコンアッセイ\* (続き)

Genotype/変異					
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Genotype/変異	$EC_{50} \pm SD (nM)$	変化 (野生型との	$EC_{90} \pm SD (nM)$	変化 (野生型との
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b Y56F	$0.7 \pm 0.4$	1.5	$2.0 \pm 1.2$	2.2
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b Y56H	$6.3 \pm 2.8$	12.6	$18.0 \pm 7.6$	19.4
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b Q80L	$1.1 \pm 0.8$	2.1	$2.8 \pm 2.4$	3.0
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b Q80R	$0.9 \pm 0.5$	1.9	$2.3 \pm 1.3$	2.5
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b Q86R	$0.1 \pm 0.1$	0.2	$0.3 \pm 0.2$	0.3
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b V107I	$0.5 \pm 0.2$	1.0	$1.1 \pm 0.5$	1.2
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b S122A	$0.4 \pm 0.2$	0.8	$1.1 \pm 0.7$	1.0
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b S122G	$0.3 \pm 0.1$	0.5	$1.0 \pm 0.3$	1.0
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b S122R	$0.3 \pm 0.1$	0.5	$1.5 \pm 1.1$	1.4
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b R155E	$1.4 \pm 0.7$	2.7	$3.8 \pm 1.8$	4.1
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b R155G	$14.2 \pm 5.4$	28.3	$29.6 \pm 3.8$	32.0
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b R155K	$1.1 \pm 0.4$	2.2	$2.4 \pm 1.0$	2.6
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b R155N	$0.9 \pm 0.9$	1.9	$2.3 \pm 1.6$	2.5
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b R155Q	$1.2 \pm 0.6$	2.4	$2.9 \pm 0.6$	3.2
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b R155S	$1.7 \pm 1.2$	3.4	$5.6 \pm 4.6$	6.0
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b R155T	$6.7 \pm 2.8$	13.3	$24.7 \pm 3.1$	26.6
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b R155W	$13.4 \pm 2.2$	26.7	$36.1 \pm 7.6$	38.9
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b A156G	$0.7 \pm 0.4$	1.4	$1.4 \pm 0.8$	1.5
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b A156S	$1.1 \pm 0.6$	2.1	$3.4 \pm 1.5$	3.7
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b A156T	$140.1 \pm 59.1$	279.5	$365.3 \pm 176.8$	394.5
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b A156V	$187.7 \pm 100.1$	374.6	$578.4 \pm 197.6$	624.6
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b D168A	$6.8 \pm 3.2$	13.6	$21.1 \pm 9.3$	22.8
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b D168E	$1.6 \pm 0.7$	3.2	$6.1 \pm 3.2$	6.6
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GT1b D168F	$38.0 \pm 15.2$	75.9	$102.6 \pm 31.4$	110.8
	GT1b D168G	$5.7 \pm 4.0$	11.3	$18.8 \pm 6.5$	20.2
GT1b D168K $60.6 \pm 44.1$ $120.9$ $247.0 \pm 104.5$ $266.7$ GT1b D168L $7.6 \pm 2.6$ $15.1$ $36.3 \pm 3.7$ $39.2$ GT1b D168N $0.4 \pm 0.2$ $0.7$ $1.6 \pm 1.0$ $1.8$ GT1b D168S $2.0 \pm 1.1$ $4.1$ $7.2 \pm 4.2$ $6.9$	GT1b D168H	$25.6 \pm 9.3$	51.0	$78.2 \pm 17.5$	84.4
GT1b D168L $7.6 \pm 2.6$ 15.1 $36.3 \pm 3.7$ $39.2$ GT1b D168N $0.4 \pm 0.2$ $0.7$ $1.6 \pm 1.0$ $1.8$ GT1b D168S $2.0 \pm 1.1$ $4.1$ $7.2 \pm 4.2$ $6.9$	GT1b D168I	$6.6 \pm 1.6$	13.2	$37.2 \pm 14.7$	40.1
GT1b D168N $0.4 \pm 0.2$ $0.7$ $1.6 \pm 1.0$ $1.8$ GT1b D168S $2.0 \pm 1.1$ $4.1$ $7.2 \pm 4.2$ $6.9$	GT1b D168K	$60.6 \pm 44.1$	120.9	$247.0 \pm 104.5$	266.7
GT1b D168S $2.0 \pm 1.1$ $4.1$ $7.2 \pm 4.2$ $6.9$	GT1b D168L	$7.6 \pm 2.6$	15.1	$36.3 \pm 3.7$	39.2
	GT1b D168N	$0.4 \pm 0.2$	0.7	$1.6 \pm 1.0$	1.8
GT1b D168T $13.0 \pm 7.7$ $26.0$ $31.2 \pm 15.0$ $33.7$	GT1b D168S	$2.0 \pm 1.1$	4.1	$7.2 \pm 4.2$	6.9
	GT1b D168T	$13.0 \pm 7.7$	26.0	$31.2 \pm 15.0$	33.7

表 2.6.2.A-13 野生型及び変異型レプリコンに対するグラゾプレビルの活性: HCV レプリコンアッセイ\* (続き)

Genotype/変異	$EC_{50} \pm SD (nM)$	EC <sub>50</sub> の倍率 変化 (野生型との 比較)	$EC_{90} \pm SD (nM)$	EC <sub>90</sub> の倍率 変化 (野生型との 比較)
GT1b D168V	$7.2 \pm 4.5$	14.4	$25.8 \pm 16.3$	27.8
GT1b D168Y	$4.2 \pm 1.9$	8.4	$13.4 \pm 5.4$	14.5
GT1b V170A	$0.7 \pm 0.2$	1.4	$2.4 \pm 0.8$	2.6
GT1b V170I	$0.4 \pm 0.3$	0.9	$1.5 \pm 1.2$	1.7
GT1b V170T	$0.5 \pm 0.2$	0.9	$1.3 \pm 0.4$	1.4
GT1b Y56H_D168A	$303 \pm 55$	758	$847 \pm 373$	941
GT1b Q80R_D168E	$17.1 \pm 8.9$	34.2	$74.0 \pm 23.4$	79.9
GT1b R155W_A156G	1540*	3080	>2000	>2000
GT1b R155W_A156G_D168N	278*	555.0	902*	974.0
GT1b T54S_Q80L_V170I	$0.47 \pm 0.2$	0.9	$1.9 \pm 0.9$	1.9
GT1b A156G_D168N	$9.0 \pm 4.0$	18.2	$42.5 \pm 13.6$	41.2
GT2a WT (JFH1)	$2.3 \pm 1.2$	1.0	$7.1 \pm 3.1$	1.0
GT2a T27I	$2.1 \pm 0.8$	0.9	$5.6 \pm 1.3$	0.8
GT2a Y56H	$21.5 \pm 14.3$	8.6	$52.1 \pm 25.2$	62.1
GT2a L175F	$4.1 \pm 2.5$	1.8	$10.9 \pm 5.9$	1.5
GT2a A156V	$472.0 \pm 132.7$	205.2	$1407.5 \pm 656.1$	198.2
GT2a D168A	$34.3 \pm 22.1$	13.7	$77.0 \pm 14.2$	91.7
GT2a D168E	$6.8 \pm 3.4$	2.7	$17.3 \pm 3.3$	20.6
GT3a WT (GLA) <sup>a</sup>	$1.4 \pm 0.3$	1.0	$4.6 \pm 2.2$	1.0
GT3a N77S <sup>a</sup>	$9.6 \pm 4.3$	6.7	$37.6 \pm 19$	8.2
GT3a V163I <sup>a</sup>	$3.8 \pm 1.6$	2.6	$14.2 \pm 5.7$	3.1
GT3a Q178R <sup>a</sup>	$7.7 \pm 2.6$	5.4	$18.5 \pm 3.3$	4.0
GT3a WT (GLA) <sup>b</sup>	$7.6 \pm 3.2$	1.0	$20.5 \pm 9.0$	1.0
GT3a Q80R <sup>b</sup>	$37.1 \pm 14.4$	4.9	$142.0 \pm 94.3$	6.9
GT3a A166S <sup>b</sup>	$13.5 \pm 6.7$	1.8	$49.1 \pm 26.4$	2.4
GT3a A166T <sup>b</sup>	$23.4 \pm 7.2$	3.1	$88.3 \pm 48.4$	4.3
GT3a Q168R <sup>b</sup>	$32.8 \pm 18.9$	4.3	$116.8 \pm 82.1$	5.7
GT3a K26R_Q168R <sup>b</sup>	$46.5 \pm 29.2$	6.1	$150.0 \pm 72.1$	7.3
GT3a (S52) _WT	$34.9 \pm 14.7$	1.0	$152.6 \pm 34.5$	1.0
GT3a P89L	$28 \pm 10$	0.8	$97 \pm 22$	0.6
GT3a P89S	21 ± 9	0.6	$68 \pm 13$	0.4

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.A-13 野生型及び変異型レプリコンに対するグラゾプレビルの活性: HCV レプリコンアッセイ\* (続き)

Genotype/変異	$EC_{50} \pm SD (nM)$	EC <sub>50</sub> の倍率 変化 (野生型との 比較)	$EC_{90} \pm SD (nM)$	EC <sub>90</sub> の倍率 変化 (野生型との 比較)
GT3a A166S	$48 \pm 26$	1.4	$130 \pm 13$	0.9
GT4a (ED43) WT	$0.3 \pm 0.2$	1.0	$0.8 \pm 0.4$	1.0
GT4a G162R	$0.7 \pm 0.5$	2.3	$1.6 \pm 1.0$	2.0
GT4a G162R_D168A	96 ± 12	320	$216 \pm 40$	270
GT4a G162R_D168V	$33 \pm 20$	110	$97 \pm 31$	121
GT5a (SA13) AF064490 WT <sup>c</sup>	$0.7 \pm 0.2$	1.0	$1.8 \pm 0.5$	1.0
GT5a D168A°	$44.4 \pm 18.7$	63.0	$154.1 \pm 121.5$	86.0
GT5a D168N°	$2.0 \pm 0.9$	2.9	$4.8 \pm 1.6$	2.7
GT5a D168V°	$11.8 \pm 3.3$	16.9	$31.7 \pm 9.2$	17.6
GT6a JN180455_WT <sup>d</sup>	$0.9 \pm 0.1$	1.0	$2.3 \pm 0.4$	1.0
GT6a Y56H <sup>d</sup>	$1.7 \pm 0.4$	1.9	$13.0 \pm 3.8$	5.7
GT6a E176G <sup>d</sup>	$1.0 \pm 0.5$	0.6	$2.0 \pm 0.14$	0.9
GT6a Y56H_E176G <sup>d</sup>	$68.4 \pm 24.1$	76	$201.3 \pm 84$	88
GT6a V158I_E176G <sup>d</sup>	$3.9 \pm 2.5$	4.3	$13.0 \pm 3.0$	5.7
GT6a D168E_E176G <sup>d</sup>	$92.8 \pm 41.9$	103	$220.5 \pm 76.4$	96
GT6a D168H_E176G <sup>d</sup>	$202.3 \pm 45.2$	225	$391.0 \pm 56.1$	170

SD=標準偏差、値は3つ以上の独立した試験における測定値の平均値、太字フォントは変異が導入された WT 配列を示す。

- \* n=1、WT=野生型
- a このキメラレプリコンは Huh7.5細胞中の GT2a(JFH1)株の GT3 GLA NS3プロテアーゼ(1~181残基)及び NS4A 配列を含む。
- b このキメラレプリコンは Huh7細胞中の GT2a (JFH1) 株の GT3 GLA NS3プロテアーゼ (1~181残基) 及 び NS4A 配列を含む。
- c このキメラレプリコンは Huh7細胞中の GT2a JFH1株の GT5 AF064490 (SA13)NS3配列を含む。
- d このキメラレプリコンは Huh7細胞中の GT1b\_N 株の GT6a (JN180455.1) NS3配列を含む。

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

グラゾプレビルは多くの GT1a 又は GT1b の変異に対して活性を示したが、その活性 ( $EC_{50}$ 値) はこれらの変異の多くでやや低下した。最も大きな低下のみられた変異は GT1b R155G/T/W、D168A/G/T/V/Y 及び A156T/V であった。通常、A156T/V 及び多くの D168変異ウイルスは複製により著しく減弱する。これら所見を総合すると、一般的な耐性変異の多くでグラゾプレビルはウイルス複製を抑制できるものと推測された。

#### 2.6.2.A.2.1.2.3 レプリコンアッセイの精度

 $EC_{50}$ 値及び  $EC_{90}$ 値により算出された野生型を1としたときの変異型の効力比について、4年以上の長期にわたるレプリコンアッセイ背景データにおける精度を検討した[資料4.2.1.1.13: MK-5172A PD016][2.6.3.A.1項、2.6.3.B.1項]。ある試験日においては、サブタイプ (GT1a 又は GT1b)、化合物 (グラゾプレビル又はエルバスビル)、蛋白修飾 (GT1a 野生型に対する GT1a Y93H) 及び

細胞株(Huh-7又は Huh-7.5)に依存して、95%信頼区間の上限は1.7~3.9倍の、99%信頼区間の上限は2.1~6.9倍の範囲を示した。これらの統計学上の上限はアッセイでのいわゆるノイズのみによると考えられた[資料4.2.1.1.13: MK-5172A PD016] [2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。同一実験における変異型と野生型の  $EC_{50}$ 値と  $EC_{90}$ 値との比の幾何平均(N=3)については、サブタイプ(Ia 又はIb)、化合物(グラゾプレビル又はエルバスビル)、蛋白修飾(Y93H 又は野生型)及び細胞株(Huh-7又は Huh-7.5)に応じた95%限界の上限はI.3~2.2倍、99%限界の上限はI.5~3.1倍の範囲であった。これらの上限は、真の比をIとした場合の、アッセイのいわゆるノイズによるばらつきと考えられた。

#### 2.6.2.A.2.1.3 一過性導入ウイルスアッセイ

[資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010]

RAV 解析を迅速に処理するため、Huh7.5細胞を用いた一過性導入 GT1a ウイルスアッセイ法を 開発した。本アッセイでは、従来の安定発現レプリコンアッセイにより得られたのと、おおむね 同等のデータが得られた。

この一過性導入ウイルスアッセイにおいて、最大の影響が D168の変異で認められ、D168A 又は D168/V 変異によりグラゾプレビルの活性に100倍又は21倍程度のシフトがみられた。 Q80K\_R155K の二重変異においてもグラゾプレビルの活性に21倍のシフトがみられた。2つ又は3つの RAV の連鎖 (例: D168変異を含む R155W\_A156G\_D168N) ではグラゾプレビルの活性は著しく低下した。HCV ゲノムで D168変異を有するものは対照とした野生型よりもフィットネスが低く、2つ目の変異 (例: R155K) の付加によりやや上昇した。HCV プロテアーゼ阻害薬の臨床試験時にみられた変異のほとんどに対し、グラゾプレビルは安定した活性を示し、その活性のシフトは5倍未満であった。[表 2.6.2.A-14] [資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010][2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。以上より、グラゾプレビルは、既存の HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害薬の先行治療による RAVを有する患者にとって、有効な選択肢となり得ると考えられた。

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.A-14 NS3 RAV に対するグラゾプレビルの活性:一過性導入ウイルスアッセイ

及 Z.O.Z.A-14 NOO NAV に対するフラフラレビルの治は、 過世等スプイルステラビイ						
変異	$EC_{50} \pm SD$ $(nM)^{1}$	倍率変化 (野生型との比較)	フィットネス比 (野生型との比較) <sup>2</sup>			
GT1a WT	$0.27 \pm 0.1$	1.0	1.0			
V55A Q80R	$3.5 \pm 1.7$	13.0	0.3			
Y56F	$0.3 \pm 0.06$	1.1	0.8			
Y56H D168A <sup>b</sup>	$263 \pm 215$	974	0.02			
Q80K <sup>a</sup>	$2.2 \pm 1.3$	8.1	1.0			
Q80K_R155K <sup>a</sup>	$11.2 \pm 4.7$	41.5	0.8			
Q80L <sup>c</sup>	$4.5 \pm 1.7$	17	0.9			
R109K	$0.6 \pm 0.11$	2.0	2.4			
S122A <sup>a</sup>	$0.2 \pm 0.1$	0.7	0.7			
S122G <sup>a</sup>	$0.3 \pm 0.1$	1.1	0.9			
S122R <sup>a</sup>	$0.8 \pm 0.6$	3.0	0.4			
S122T <sup>a</sup>	$0.6 \pm 0.2$	2.2	0.8			
S122A R155K <sup>a</sup>	$2.0 \pm 0.4$	7.4	0.5			
S122G R155K <sup>a</sup>	$2.9 \pm 0.5$	10.7	0.8			
S122N R155K <sup>a</sup>	$1.5 \pm 0.2$	5.6	0.9			
S122R R155K <sup>a</sup>	1.9 ±1.1	7.0	0.1			
S122T R155K <sup>a</sup>	$1.8 \pm 0.6$	6.7	1.0			
I132V <sup>d</sup>	$0.4 \pm 0.2$	1.3	0.7			
R155K <sup>a</sup>	$2.5 \pm 1.4$	9.3	0.4			
R155K D168A <sup>a</sup>	$1.9 \pm 0.7$	7.0	0.7			
R155K D168E <sup>a</sup>	$1.0 \pm 0.7$	3.7	0.7			
R155K D168V <sup>a</sup>	$2.0 \pm 1.2$	7.4	1.3			
R155W <sup>b</sup>	$5.9 \pm 4.3$	21.9	0.1			
R155W A156G <sup>b</sup>	$8.8 \pm 1.1$	32.6	0.006			
R155W A156G D168N <sup>b</sup>	$1286 \pm 905$	4763	0.9			
R155Q A156S D168G <sup>b</sup>	$30 \pm 10$	111.1	0.4			
A156G <sup>b</sup>	$1.2 \pm 1.0$	4.4	1			
A156L <sup>b</sup>	2732*	10119	0.02			
A156T D168N <sup>b</sup>	$1074 \pm 1151$	3978	0.05			
D168A <sup>a,b</sup>	82 ± 12	304	0.5			
D168E <sup>a,b</sup>	$11 \pm 1.3$	41	0.4			
D168N <sup>e</sup>	$2.4 \pm 1.6$	37	0.6			
D168V <sup>a,c</sup>	46 ± 20	170	0.3			
I170V <sup>e</sup>	$0.7 \pm 0.3$	2.3	1.3			
1 亚杓+SD (N>2)						

- 1 平均±SD (N≥3)
- 2 フィットネスの範囲: ≤0.02=不適応、0.03~0.5=中等度、>0.5=適応
- a シメプレビルの臨床試験でみられた RAV
- b グラゾプレビルの第Ⅱ相臨床試験でみられた RAV
- c バニプレビルの臨床試験でみられた RAV
- d テラプレビルの臨床試験でみられた RAV
- e ボセプレビルの臨床試験でみられた RAV
- \* n=1、SD=標準偏差、WT=野生型
- [2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010]

# 2.6.2.A.2.1.4 交差耐性

[資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005][資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010] 慢性 HCV 感染治療薬として既存の NS3/4A 及び NS5A 阻害薬の臨床試験でみられた RAV との交差耐性の有無を検討した。

# 2.6.2.A.2.1.4.1 臨床試験でみられた HCV GT1 NS3 RAV に対するグラゾプレビル及び 他の HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害薬の活性

臨床試験でみられた NS3 RAV を含む GT1レプリコンに対する、グラゾプレビル及び他の NS3/4A プロテアーゼ阻害薬の活性を評価した[資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005][2.6.3.A.1項]。概して大環状ペプチド構造を有する阻害薬(グラゾプレビル、シメプレビル、パリタプレビル)のレプリコンに対する活性は、直鎖状構造の阻害薬(ボセプレビル、テラプレビル)よりも高かった。大環状構造を有する阻害薬では、グラゾプレビルの活性が最も高かった。第一世代のプロテアーゼ阻害薬でよくみられる RAV(シメプレビル無効例を含む GT1a 感染患者の大部分でみられる Q80K 等)の多くに対し、グラゾプレビルは活性を示した。グラゾプレビルへの感受性が低下した GT1 RAV では、概して他の大環状構造を有する阻害薬に対しても耐性が認められ、阻害薬クラスとして交差耐性が示された。データを[表 2.6.2.A-15]に示す。

# グラゾプレビル/エルバスビル

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

# 表 2.6.2.A-15 GT1 NS3 RAV に対するグラゾプレビル及び既存の NS3/4A プロテアーゼ阻害薬の阻害活性

	グラゾプレ	ビル	ボセプレ	ビル	テラプレヒ	ジル	シメプレ	ビル	パリタプレ	ノビル
レプリコン	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 <sup>b</sup>	$EC_{50} \pm SD^a (nM)$	倍率 変化 <sup>b</sup>	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 b	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 <sup>b</sup>	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 <sup>b</sup>
GT1a WT (H77S)	$0.19 \pm 0.03$	1.0	$332 \pm 167$	1.0	$264 \pm 156$	1.0	$1.5 \pm 1.8$	1.0	$1.4 \pm 1.0$	1.0
GT1a V36A	$0.3 \pm 0.2$	1.5	$866 \pm 178$	2.6	$373 \pm 231$	1.7	$2.7 \pm 1.6$	1.9	$3.5 \pm 2.6$	2.4
GT1a T54S	$0.3 \pm 0.2$	1.5	$2465 \pm 321$	8.3	$1330 \pm 157$	5.0	$4.9 \pm 0.6$	3.4	$12.1 \pm 1.7$	8.5
GT1a V55I	$0.1 \pm 0.1$	0.7	$278 \pm 38$	0.8	$235 \pm 79$	0.9	$2.2 \pm 1.2$	1.5	$2.9 \pm 0.8$	2.0
GT1a Y56H	$3.3 \pm 2.2$	17.7	$362 \pm 242$	1.1	$219.5 \pm 101.8$	0.8	$25.1 \pm 13.8$	17.2	$16.8 \pm 16.1$	11.8
GT1a Q80K	$0.43 \pm 0.38$	2.3	$180 \pm 73$	0.5	$154 \pm 17$	0.6	14 ± 7	9.7	$8.7 \pm 3.7$	6.1
GT1a S122R	$0.3 \pm 0.1$	1.8	$110 \pm 44$	0.3	$141 \pm 76$	0.5	$114 \pm 50$	77.9	$26.4 \pm 12.1$	18.6
GT1a R155K	$0.5 \pm 0.2$	2.6	$482 \pm 314$	1.5	92 ± 8	0.3	19 ± 9	13.0	$20.0 \pm 20.8$	14.1
GT1a A156S	$0.4 \pm 0.1$	2.2	$2850 \pm 1027$	8.6	$221 \pm 101$	0.8	$0.07 \pm 0.04$	0.1	$0.5 \pm 0.2$	0.3
GT1a D168A	$26 \pm 4$	138.8	$46 \pm 22$	0.1	$15 \pm 9$	0.1	$82 \pm 63$	56.4	$25.8 \pm 17.9$	18.1
GT1a D168E	$4.8 \pm 2.0$	25.4	$185 \pm 61$	0.6	$141 \pm 89$	0.5	19 ± 9	13.2	$24.0 \pm 3.1$	16.8
GT1a D168N	$1.5 \pm 0.7$	8.0	$233 \pm 216$	0.7	$102 \pm 95$	0.4	$4.5 \pm 3.0$	3.1	$8.2 \pm 5.1$	5.7
GT1a D168Y	19 ± 9	103.8	$167 \pm 44$	0.5	79 ± 3	0.3	$1658 \pm 382$	1134	$128.9 \pm 58.7$	90.6
GT1a I170T	$0.5 \pm 0.2$	2.5	$477 \pm 174$	1.4	$515 \pm 234$	2.0	$10.9 \pm 3.7$	7.5	$4.2 \pm 2.3$	2.9

(続く)

### グラゾプレビル/エルバスビル

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

# 表 2.6.2.A-15 GT1 NS3 RAV に対するグラゾプレビル及び既存の NS3/4A プロテアーゼ阻害薬の阻害活性(続き)

	グラゾプレ	ビル	ボセプレ	ビル	テラプレヒ	ゴル	シメプレ	ビル	パリタプレ	ノビル
レプリコン	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 <sup>b</sup>	$EC_{50} \pm SD^a (nM)$	倍率 変化 <sup>b</sup>	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 <sup>b</sup>	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 <sup>b</sup>	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 <sup>b</sup>
GT1b WT (Con1)	$0.3 \pm 0.2$	1.0	219 ± 141	1.0	131 ± 99	1.0	$0.3 \pm 0.3$	1.0	$0.4 \pm 0.1$	1.0
GT1b V36A	$0.7 \pm 0.3$	2.2	$909 \pm 988$	4.2	$70 \pm 19$	0.5	$0.3 \pm 0.2$	1.0	$0.8 \pm 0.3$	2.2
GT1b T54S	$0.4 \pm 0.2$	1.2	$1056 \pm 894$	4.8	$65 \pm 55$	0.5	$0.1 \pm 0.1$	0.5	$0.6 \pm 0.3$	1.7
GT1b V55A	$0.5 \pm 0.5$	1.6	$703 \pm 403$	3.2	$153 \pm 42$	1.2	$0.2 \pm 0.3$	0.9	$0.5 \pm 0.3$	1.3
GT1b Y56H	$15.3 \pm 3.2$	48.1	$159 \pm 61$	0.7	$86 \pm 56$	0.7	16 ±13	60	$2.8 \pm 2.6$	7.9
GT1b Q80R	$0.2 \pm 0.2$	0.6	$66 \pm 58$	0.3	$60 \pm 28$	0.5	$2.5 \pm 0.9$	9	$0.7 \pm 0.4$	2.1
GT1b A156T	>100	>333	$4653 \pm 3941$	21.3	69 ± 7	0.5	$37 \pm 21$	139	$3.8 \pm 1.4$	10.8
GT1b D168A	$37.9 \pm 9.5$	119.3	$166 \pm 33$	0.8	$26 \pm 12$	0.2	$2033 \pm 484$	7646	$87 \pm 37$	243.5
GT1b D168E	$4.3 \pm 2.9$	13.4	$190 \pm 94$	0.9	$50 \pm 42$	0.4	$23 \pm 14$	85	$3.1 \pm 2.8$	8.6
GT1b D168N	$0.4 \pm 0.4$	1.4	$112 \pm 127$	0.5	44 ± 15	0.3	$3.2 \pm 0.7$	12	$2.0 \pm 1.2$	5.5
GT1b D168V	15 ± 2	46.4	$75 \pm 35$	0.3	51 ± 27	0.4	$8280 \pm 1849$	31148	$113 \pm 94$	315.7
GT1b V170A	$0.4 \pm 0.4$	1.3	$2785 \pm 1837$	12.7	$68 \pm 77$	0.5	$0.06 \pm 0.03$	0.2	$0.7 \pm 0.2$	1.8

a 平均値±標準偏差

SD=標準偏差

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

b 野生型と比較した場合の阻害活性の倍率変化

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

他の NS5A 阻害薬(レディパスビル又はオムビタスビル)投与患者でみられた NS5A RAV の安定発現 GT1b レプリコン細胞を用いて、グラゾプレビル及び他の NS3/4A プロテアーゼ阻害薬の活性を評価した。その結果、グラゾプレビル及び検討した他のプロテアーゼ阻害薬に対する NS5A RAV による著しい影響は認められず、交差耐性はないことが示された。データを[表 2.6.2.A-16] に示す。

表 2.6.2.A-16 GT1b NS5A に対するグラゾプレビル及び既存の NS3/4A プロテアーゼ阻害薬の阻害活性

	グラゾプレ	ビル	ボセプレ	ビル	テラプレ	ビル	シメプレヒ	ジル	パリタプレ	ビル
レプリコン	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 b	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 b	$EC_{50} \pm SD^{a}$ (nM)	倍率 変化 b	$EC_{50} \pm SD^{a}$ (nM)	倍率 変化 b	$EC_{50} \pm SD^{a}$ (nM)	倍率 変化 b
GT1b_con1 (WT)	$0.3 \pm 0.2$	1.0	219 ± 141	1.0	131 ± 99	1.0	$0.3 \pm 0.3$	1.0	$0.4 \pm 0.1$	1.0
GT1b L31I	$0.21 \pm 0.03$	0.7	$323 \pm 105$	1.5	$282 \pm 146$	4.0	$0.42 \pm 0.18$	1.6	$0.63 \pm 0.52$	1.8
GT1b L31M	$0.26 \pm 0.21$	0.8	$327 \pm 158$	1.5	$247 \pm 143$	1.9	$0.05\pm0.04$	0.2	$0.7 \pm 0.5$	2.0
GT1b L31V	$0.2 \pm 0.19$	0.6	$281 \pm 138$	1.3	$480 \pm 125$	3.7	$0.06 \pm 0.03$	0.3	$0.39 \pm 0.29$	1.1
GT1b Y93H	$0.19 \pm 0.02$	0.6	$337 \pm 70$	1.5	$130 \pm 4$	1.0	$0.21 \pm 0.19$	0.8	$0.51 \pm 0.46$	1.4

a 平均値±標準偏差

SD=標準偏差

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005]

レディパスビル又はオムビタスビル投与患者でみられた NS5A RAV の GT1a 一過性導入ウイルスアッセイを用いて、グラゾプレビル及び他の NS3/4A プロテアーゼ阻害薬の活性を評価した[資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010] [2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。その結果、グラゾプレビル及び検討した他のプロテアーゼ阻害薬に対する NS5A RAV の交差耐性は認められなかった。データの要約を[表2.6.2.A-17]に示す。

b 野生型と比較した場合の阻害活性の倍率変化

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.A-17 GT1a NS5A RAV に対するグラゾプレビル及び他の NS3/4A プロテアーゼ阻害薬の 活性:一過性導入ウイルスアッセイ

	グラゾプレ	ビル	ボセプレ	ビル	テラプレ	ビル	シメプレ	ビル	パリタプロ	ノビル
変異	$EC_{50} \pm SD^{a}$ $(nM)$	倍率 変化 <sup>b</sup>								
WT	$0.6 \pm 0.3$	1.0	$1388 \pm 346$	1.0	$1428 \pm 279$	1.0	$11 \pm 2.6$	1.0	$13 \pm 7.8$	1.0
M28A	$0.5 \pm 0.2$	0.8	$1531 \pm 563$	1.1	$1330 \pm 228$	0.9	8 ± 2.1	0.7	$12 \pm 8.1$	0.9
M28T	$0.5 \pm 0.2$	0.8	$909 \pm 95$	0.7	$1718 \pm 284$	1.2	$8 \pm 0.7$	0.7	$15 \pm 9.5$	1.1
M28V	$0.5 \pm 0.03$	0.9	$1025 \pm 209$	0.7	1591 ± 444	1.1	$8 \pm 0.6$	0.8	$17 \pm 9.5$	1.3
Q30E	$0.5 \pm 0.2$	0.9	$1391 \pm 524$	0.9	$1406 \pm 100$	1.0	$10 \pm 2.0$	0.9	$13 \pm 2.6$	1.0
Q30H	$0.9 \pm 0.3$	1.5	$1125 \pm 89$	0.8	$1703 \pm 322$	1.2	$13 \pm 2.1$	1.2	$14 \pm 2.5$	1.0
Q30K	$0.9 \pm 0.5$	1.5	$960 \pm 100$	0.7	$1335 \pm 63$	0.9	$11 \pm 3.2$	1.1	$11 \pm 3.0$	0.8
Q30L	$0.9 \pm 0.4$	1.5	$1604 \pm 365$	1.2	$1374 \pm 166$	1.0	$12 \pm 2.5$	1.2	$12 \pm 6.7$	0.9
Q30R	$0.6 \pm 0$	1.0	$1097 \pm 97$	0.8	$1529 \pm 388$	1.1	$10 \pm 0.6$	1.0	9 ± 1.5	0.7
L31M	$0.7\pm0.3$	1.1	$1255 \pm 51$	0.9	$1764 \pm 450$	1.2	$10 \pm 4$	0.9	$19 \pm 14.4$	1.4
L31V	$0.7\pm0.4$	1.2	$1154 \pm 121$	0.8	$1515 \pm 91$	1.1	$10 \pm 3.5$	0.9	$16 \pm 11.2$	1.2
H58D	$0.6 \pm 0.3$	0.9	$1188 \pm 176$	0.9	$1521 \pm 248$	1.1	$10 \pm 3.5$	0.9	$13 \pm 8.5$	1.0
H58P	$0.7 \pm 0.4$	1.1	$1151 \pm 271$	0.8	$1329 \pm 193$	0.9	$10 \pm 1.7$	0.9	$12 \pm 6.1$	0.9
Y93C	$0.4 \pm 0.3$	0.7	$611 \pm 231$	0.4	$690 \pm 191$	0.5	$6 \pm 2.4$	0.6	3 ± 2.3	0.2
Y93N	$0.6 \pm 0.3$	1.1	$681 \pm 143$	0.5	$868 \pm 239$	0.6	$5 \pm 2.0$	0.5	5 ± 3.4	0.4
Y93H	$0.6 \pm 0.3$	1.0	$773 \pm 144$	0.6	$988 \pm 299$	0.7	5 ± 1.6	0.5	$7 \pm 4.8$	0.5

a 平均値±標準偏差

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010]

# 2.6.2.A.2.1.5 併用試験

[資料4.2.1.1: MK-5172 PD003] [資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008] [資料4.2.1.1.12: MK-2248A PD001] [資料4.2.1.1.14: MK-5172A PD017]

# 2.6.2.A.2.1.5.1 グラゾプレビル及びインターフェロン又はリバビリンの併用試験

グラゾプレビル及びインターフェロン又はリバビリンの併用によるウイルス RNA 複製への影響を、GTlb サブゲノムレプリコンを用いたレプリコン系で評価した。グラゾプレビルの阻害作用を、単独又はインターフェロン  $\alpha$  若しくはリバビリンとの併用により比較検討した。測定値はコンピュータソフトウェア MacSynergy II で自動解析し、ウイルス RNA 複製に対する相乗的な阻害活性の可能性を検討した。このソフトウェアは、各薬物の諸種濃度での併用時のデータを応答曲面にみたてて3次元モデル化するものである。応答曲面により得られる正の値は相乗作用の、負の値は拮抗作用の、ゼロ値又はゼロに近い値は相加作用の濃度域を示す[資料4.2.1.1: MK-5172 PD003] [2.6.3.A.1項]。

グラゾプレビル及びインターフェロン $\alpha$ のごく軽度の相乗作用が、両薬物の低濃度存在下で認められた。しかし、相乗作用を示す値は低く、また、これらの作用は両薬物単独でも検出された

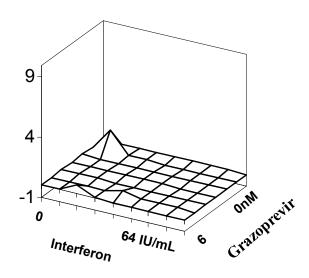


b 野生型と比較した場合の阻害活性の倍率変化

SD=標準偏差

ことから、この相乗作用は最大でも軽微なものと考えられる。同様に、グラゾプレビル及びリバビリンの相乗作用も、グラゾプレビルの低濃度及びリバビリンの中~高濃度でごく軽度でみられたにすぎなかった。結論として、グラゾプレビルとインターフェロン  $\alpha$  又はリバビリンとの併用作用は相加的であり、拮抗作用のないことが示された[図 2.6.2.A-2]。

# A. グラゾプレビル及びインターフェロン $\alpha$



# B. グラゾプレビル及びリバビリン

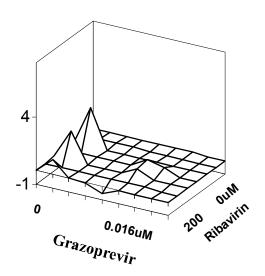


図 2.6.2.A-2 グラゾプレビル及びインターフェロン α 又はリバビリンの併用による相加作用 [2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1: MK-5172 PD003]

# 2.6.2.A.2.1.5.2 グラゾプレビル及びエルバスビル(HCV NS5A 阻害薬)の併用試験

グラゾプレビル及びエルバスビル(HCV NS5A 阻害薬)の併用による GT1a レプリコンに対する抗ウイルス活性を、3日間のレプリコンアッセイで検討した[資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008] [2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。検討したいずれの濃度の組合せにおいても細胞毒性は認められなかった。抗ウイルスデータの解析にはコンピュータソフトウェア MacSynergy<sup>TM</sup> II を用いた。この解析法は HCV RNA 阻害率(%)及び TaqMan 解析で実験的に算出された直接的なサイクル閾値数(Ct)を用いる統計手法である。MacSynergy 解析では、軽度ながら有意な相乗作用が3つの実験のうち1つで認められ、他の2つの実験では相加的な抗ウイルス作用がみられた[表 2.6.2.A-18]。この直接 Ct 解析により3つの実験を併合したところ、弱いながらも統計学的に有意な相乗作用(0.6 Ct 以下)を示す小さな領域が認められた。また、相加作用よりも明らかに弱い抗ウイルス作用を示す2つの領域も認められた。1つは両薬物の高濃度の併用でみられたが、他の1つはグラゾプレビルの高濃度とエルバスビルの中~低濃度の併用で認められた。いずれの場合も Ct 値は高く、本アッセイで測定可能な最大阻害作用に近かった。本アッセイの限界は、HCV RNA の半減期が長いこと及び3日間アッセイにおける RNA 分解に限度があることに起因すると考えられた。両解析結果をまとめると、グラゾプレビル及びエルバスビルの併用により、濃度範囲の大部分で相加作用が認められ、拮抗作用のないことが示された。

表 2.6.2.A-18 エルバスビル及びグラゾプレビル併用による作用: MacSynergy 解析

併用薬物	対数容積、 相乗作用/拮抗作用、 CI 95%	作用	
ガニゾーシュスティー	4.42/-0.03	軽度ながら有意な相乗作用	
グラゾプレビル+ エルバスビル	0.5/-0.45	相加作用	
エルハスしル	0.66/-0.24	相加作用	

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008]

さらに、グラゾプレビル及びエルバスビルの併用時の活性について、GT1a レプリコン細胞を用いた耐性の抑制評価により検討した。各薬物の単独又は併用処理により、 $EC_{90}$ 値の倍数に伴って耐性コロニー数の低下(播種細胞数の%として算出)が認められた[表 2.6.2.A-19]。グラゾプレビル単独では  $EC_{90}$ 値の100倍、エルバスビルは  $EC_{90}$ 値の1000倍の濃度で耐性コロニーの出現を抑制された[資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008][2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。併用において、それぞれの化合物は各  $EC_{90}$ 値の106倍で耐性コロニーの出現を抑制した。極めて低濃度の併用により耐性コロニー数の濃度依存的な減少が認められた[図 2.6.2.A-3]。

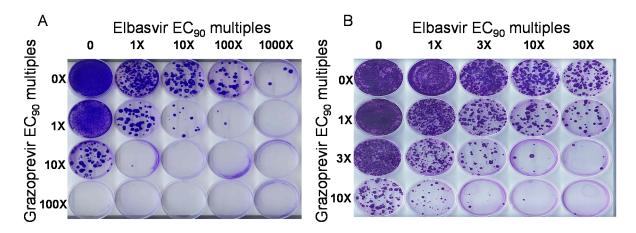


図 2.6.2.A-3 GT1a レプリコン細胞でのエルバスビル及びグラゾプレビル (NS3/4A プロテアー ゼ阻害薬) 併用時の耐性抑制活性: 培養皿の画像

 $EC_{90}$ 値の倍数を表記した。GT1a に対するエルバスビル及びグラゾプレビルの  $EC_{90}$ 値はそれぞれ0.006~nM 及び0.9~nM であった。

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008]

概して、併用時には EC<sub>90</sub>値の倍数の増加に伴って耐性コロニー数が減少したことから、ごくわ ずかな相加作用のあることが示唆された[表 2.6.2.A-19]。耐性コロニーのレプリコン配列データの 解析より、NS3プロテアーゼ阻害薬又は NS5A 阻害薬のいずれかの耐性に関連して生じた主要な アミノ酸変異が明らかとなった。NS3で特定された主な変異は、R155K及びD168A/E/S/Vであっ た。また、複製に影響することが知られている Q41R 及び R109A の変異も認められた。NS5A で 特定された主な変異は、K24E/R/T、M28T/K、O30D/E/H/K/R、L31M/V 及び Y93C/H/N であった。 その他、K20E/M/R 及び R81M/S/W 変異も認められた。各 EC%値 (1倍以上) での併用時にみられ た耐性細胞のクローン配列分析より、両阻害薬に連鎖した変異(両標的蛋白において2つ以上)の みが認められた。これより、両阻害薬併用時には高い選択圧がかかることが明らかとなった。連 鎖してみられた変異のほとんどは、NS3の R155K 又は D168E/V のいずれかと NS5A の Q30D/H/R の変異に関連したものであった。NS3及び NS5A による変異のうちいくつかは一過性導入ウイル スアッセイにおいてフィットネス (fitness:適応度) が極めて低かった。たとえば、R155K\_Q30D 及び D168A M28K をコードする連鎖した変異(それぞれ NS3及び NS5A RAV を構成する)のフ ィットネスは極めて低かった(野生型の0.01未満)。一部の変異でフィットネスが低下したのは、 グラゾプレビル及びエルバスビル併用時の安定した活性によるものと考えられる。連鎖した変異 (R155K L31M Y93C及びR155K K24T Q30R) はわずかに適応し、野生型を1としたときの相対 的なフィットネス値はそれぞれ0.14及び0.34であった。両変異に対するグラゾプレビルの EC50値 はそれぞれ1.6 nM 及び0.6 nM であり、これらの連鎖した変異に対する活性低下の程度はそれぞれ 1/2.7及び1/4.5であった。R155K L31M Y93C 変異でのエルバスビルの活性は著しく低く、EC50値

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

は54.4 nM であり、活性低下の程度は1/54400であった(R155K\_K24T\_Q30R に対する EC<sub>50</sub>値は 0.45 nM であり、活性低下の程度は1/450)。エルバスビルの活性低下の程度が大きかったのは、NS5A での多重変異の存在を反映したものと考えられる[2.6.2.B.2.1.2.2項]。

以上を要約すると、グラゾプレビル及びエルバスビルの併用により耐性コロニー出現数は安定して減少した。耐性コロニーの出現は  $EC_{90}$ 値の低い倍数での濃度でのみ認められ、複数のヌクレオチド変異を必要とすることから、併用時では耐性出現に対する遺伝的障壁が高いことが示唆された。また、併用時には  $EC_{90}$ 値の10倍を超える濃度で耐性コロニーの出現が抑制された。

表 2.6.2.A-19 グラゾプレビル及びエルバスビルによる耐性コロニー選択(播種細胞数の%):
GT1a レプリコン細胞

		エルバスビル EC <sub>90</sub> 値の倍数 <sup>a</sup>						
		0倍	1倍	3倍	10倍	30倍		
	0倍	(100 <sup>b</sup> )	TMTC <sup>c</sup>	293 (0.15)	181 (0.09)	144 (0.072)		
グラゾプレビル ª	1倍	TMTC	435 (0.22)	179 (0.09)	82 (0.04)	39 (0.02)		
EC <sub>90</sub> 値の倍数	3倍	~1000 (~0.5)	255 (0.12)	83 (0.042)	9 (0.0045)	1 (0.0020)		
	10倍	120 (0.06)	38 (0.019)	9 (0.0045)	1 (0.0005)	0		

グラゾプレビル  $EC_{90}$ 値=1.5 nM、エルバスビル  $EC_{90}$ 値=6 pM

- a 各濃度について2×10<sup>5</sup>個の細胞を播種した培養皿を3~4枚使用
- b 薬物無添加時を100%とした。
- c コロニー過多のため計測不可 (Too Many To Count; TMTC): 細胞継代により定量不可

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008]

# 2.6.2.A.2.1.5.3 グラゾプレビル及び MK-2248(HCV NS5B ヌクレオシド阻害薬)の併用試験

グラゾプレビル及び MK-2248 (ウリジンヌクレオシドのプロドラッグ) 併用時の活性を検討した[資料4.2.1.1.12: MK-2248A PD001] [2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。併用時の各濃度での阻害作用と予測された相加作用の差を用いて相乗容積及び拮抗容積を算出した[表 2.6.2.A-20]。コンピュータソフトウェア MacSynergy II の解析によると、3回のうち2回で強力な相乗作用が認められたが、残る1回の対数容積の推定値が高過ぎたため解析パラメータにより無効とされた。いずれの場合も、この併用による拮抗作用は認められなかった。

表 2.6.2.A-20 グラゾプ	ィビル及び MK-2248 併用による作	目:MacSvnergv解析
-------------------	----------------------	----------------

併用薬物	対数容積、 相乗作用/拮抗作用、 CI 95%	作用
ガニゾプレレル	45.98/0	強い相乗作用
グラゾプレビル+ MK-2248	10.88/0	強い相乗作用
IVIK-2248	241.36/0	無効なデータ

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.12: MK-2248A PD001]

直接 Ct 解析により3回の試験を併合解析したところ、各試験に見かけの相乗作用を示す領域が認められた。併合解析において、統計学的に有意な(p<0.01及び<0.001)相乗作用を示す領域の存在が推測された[資料4.2.1.1.12: MK-2248A PD001] [2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。

# 2.6.2.A.2.1.5.4 グラゾプレビル及びソホスブビル (HCV NS5B ヌクレオシド阻害薬) の 併用試験

グラゾプレビル及びソホスブビル(NS5B ポリメラーゼヌクレオシド阻害薬)併用時のレプリコン細胞を用いた抗ウイルス活性を検討した[資料4.3:13]。各薬物の濃度は、それぞれ GT1a 及び GT3a レプリコン細胞での  $EC_{50}$ 値をもとに設定した。各濃度による3回の併用試験において測定された阻害作用と予測された相加作用の差を、MacSynergy  $^{TM}$  解析により相乗容積及び拮抗容積として算出した[表 2.6.2.A-21]。グラゾプレビル及びソホスブビルの併用では、GT1a 及び GT3a レプリコン細胞の複製に対して相加作用から相乗作用が認められ、拮抗作用はみられなかった。本試験成績(相対 RNA 量へは変換せず)の直接 Ct 解析結果より、GT1a 及び GT3a レプリコン細胞のいずれにおいてもレプリコン細胞内での HCV RNA 複製に対する相加作用から相乗作用が認められた[資料4.2.1.1.14: MK-5172A PD017] [Sec. 2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1]。

表 2.6.2.A-21 グラゾプレビル及びソホスブビル併用による作用: MacSynergy 解析

GT1a								
併用薬物	対数容積、相乗作用	/拮抗作用(CI 95%)	作用					
#=\P-1.181	試験1	11.85/-1.23	強い相乗作用					
グラゾプレビル + ソホスブビル	試験2	17.47/-0.06	強い相乗作用					
+ / \( \( \) \( \) \( \)	試験3	0.39/-0.08	相加作用					
	(	GT3a						
併用薬物	対数容積、相乗作用	/拮抗作用(CI 95%)	作用					
ガニゾー・ロスコ	試験1	2.23/-0.05	相加作用					
グラゾプレビル + ソホスブビル	試験2	1.01/0	相加作用					
+ / \( \lambda \) \( \lambda \)	試験3	0.21/-2.88	相加作用/弱い拮抗作用					

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.1.14: MK-5172A PD017]

以上、酵素レベル及び細胞レベルでの試験の結果をまとめると、グラゾプレビルは強力な HCV NS3/4a プロテアーゼ阻害薬であり、幅広い genotype において、既存 NS3/4A プロテアーゼ阻害薬により臨床でみられた耐性変異に対して広く活性が認められた。 さらに、NS5A 又は NS5B において高頻度でみられる耐性変異に対する交差耐性は認められなかった[資料4.3: 14]。グラゾプレビル及びインターフェロン $\alpha$ 、リバビリン、ソホスブビル又はエルバスビルの併用では、in vitro での拮抗作用はみられず、MK-2248との併用では相乗作用が認められた。また、グラゾプレビル及びエルバスビルの併用により耐性出現は極めて有効に抑制された。

#### 2.6.2.A.2.2 In Vivo 試験

[資料4.2.1.1.4: MK-5172 PD004]

培養細胞などで認められた in vitro でのグラゾプレビルの活性を、in vivo チンパンジーモデルを用いて更に検討した (にて実施)。グラゾプレビルを Tang (フルーツ風味の粉末)で製剤化し、チンパンジーに1日2回経口投与した。チンパンジーが投与を拒んだ際には極く小量のケタミンで麻酔し、強制経口投与した。ウイルス量を測定するため、ケタミン軽麻酔下に血液サンプルを採取し、1時間以内に血漿化した。ウイルス量の測定には HCV 定量的 PCR アッセイ (Cenetron 社 test code: 1210、定量下限15 IU/mL)を用いた。

グラゾプレビルは GT1野生型及び R155K を含むウイルス集団のウイルス量をともに抑制した。グラゾプレビル1 mg/kg の1日2回、7日間投与により、GT1b 感染チンパンジーの血漿中 HCV RNA 量は4~5 log 減少した。GT1a 感染チンパンジーでは、グラゾプレビルの投与によりウイルス量が約3.5 log 減少した。投与中止後のウイルス量には急速なリバウンドが認められた。耐性ウイルスの配列には、R155K 変異が主要な耐性変異として認められた(MK-5172 PD004)[2.6.3.A.1項]。しかし、R155K 変異ウイルスに感染したチンパンジーにおいてもグラゾプレビルは極めて有効であり、ウイルス量を約2 log 減少させた。グラゾプレビル1 mg/kg の1日2回、7日間経口投与後の肝臓中グラゾプレビル濃度は約1  $\mu$ M 以上であった。プロテアーゼ遺伝子に新たな変異は認められなかった。試験期間を通じた観察において、チンパンジーに異常は認められなかった。また、血液学的又は臨床生化学的検査項目の変化は認められなかった[資料4.2.1.1.4: MK-5172 PD004] [2.6.3.A.1項]。

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

#### 2.6.2.A.3 副次的薬理試験

2.6.2.A.3.1 In Vitro 薬理試験

#### 2.6.2.A.3.1.1 グラゾプレビルの非標的分子に対する活性

[資料4.2.1.1.6: MK-5172 PD006] [資料4.2.1.2.1: MK-5172 PD007]

HCV NS3/4A はセリンプロテアーゼであることから、ヒトセリンプロテアーゼを介した反応に ついて、グラゾプレビルの阻害作用を検討した。グラゾプレビルはエラスターゼ及びトリプシン への優れた選択性( $IC_{50}$ 値>100  $\mu$ M)を示した。キモトリプシンへの中等度の阻害作用( $IC_{50}$ 値 1.495 μM) がみられたが、その選択性は373,750倍であった[資料4.2.1.1.6: MK-5172 PD006] [2.6.3.A.1項]。

.で実施した各種酵素及び受容体などの非標的分子を対象とした一連のアッセ イにおいて、阻害作用の ED<sub>50</sub>値が100 μM を下回ったのは計11の分子であった[資料4.2.1.2.1: MK-5172 PD007] [2.6.3.A.1項]。それらへの活性 ( $IC_{50}$ 値) はすべて1  $\mu$ M を上回っていたことから、 GT1b プロテアーゼに対する活性と比較した選択性は、いずれの場合も1,000,000倍を上回った。 データを[表 2.6.2.A-22]に示す。

アッセイ  $IC_{50}$ ,  $\mu M$ GT1b 酵素との選択性 マトリックスメタロプロテアーゼ-1 1.47 367,500 マトリックスメタロプロテアーゼ-12 6.89 1,722,500 リポオキシゲナーゼ5-LO 2.84 710,000 ホスホジエステラーゼ PDE 1 7,750,000 31 ホスホジエステラーゼ PDE 4 81.4 20,350,000 ホスホジエステラーゼ PDE 5 94.4 23,600,000 ホスホジエステラーゼ PDE 6 22 5,500,000 MAPK 3 (ERK1) 45.7 11,425,000 蛋白質トレオニンキナーゼ、PKA、非選択的 55.6 13,900,000 K チャネル hERG

3.33

6.49

表 2.6.2.A-22 非標的分子に対する活性(<100 μM)

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.2.1: MK-5172 PD007]

\_ プロスタノイド FP

#### カルボキシルエステラーゼ1/2及びカテプシン A の阻害作用 2.6.2.A.3.1.2

[資料4.2.1.2.4: MK-5172A PD012]

682,500

1,622,500

グラゾプレビルのカルボキシルエステラーゼ(CES)阻害作用を検討するため、4-NPAを基質 とした遺伝子組み換え CES1/2酵素アッセイを行った。CES1/2による4-NPA の加水分解から生じた 4-ニトロフェノールの実時間動態での分光光度測定(波長405 nm)を行った。グラゾプレビルに よる CES1/2阻害の IC<sub>50</sub>値は100 μM を上回った。データを[表 2.6.2.A-23]に示す[資料4.2.1.2.4: MK-5172A PD012][2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。

カテプシン A(Cat A)を介したヌクレオシド・プロドラッグ基質の加水分解を評価するために、 2.6.2 薬理試験の概要文



遺伝子組み換えヒト Cat A (Cat L による予備活性化後)を用いて、LC-TOF/MS による測定を行った。グラゾプレビル存在下で測定可能な Cat A 活性阻害は認められなかった。データを[表 2.6.2.A-23]に示す。これより、Cat A 阻害に関するグラゾプレビルの  $IC_{50}$ 値は本化合物の溶解上限を上回ると判断された。

表 2.6.2.A-23 CES1、CES2 及び CatA に対するグラゾプレビルの阻害活性

阻害活性の IC <sub>50</sub> (μM)							
CES1	CES2	Cat A					
157	105	>200					

[2.6.3.A.1項] [資料4.2.1.2.4: MK-5172A PD012]

以上より、グラゾプレビルは CES1/2又は Cat A を介したプロドラッグ及び他の治療薬との併用 時の代謝に影響を及ぼさないことが示唆された。

## 2.6.2.A.3.1.3 他のウイルスに対するグラゾプレビルの活性

[資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011][資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015] [資料4.2.1.2.5: MK-5172A PD014]

### 2.6.2.A.3.1.3.1 HIV 感染アッセイでのグラゾプレビルの活性

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染に対するグラゾプレビルの活性を検討するために、MT4-gag-GFP clone D3(MT4-GFP)細胞を用いた多重感染アッセイを行った[資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011] [2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。MT4-GFP 細胞は、HIV-1蛋白質(tat: trans-activating regulatory protein、及び rev: regulator of expression of virion protein)に応じて GFP レポーター遺伝子を発現するように改変した MT-4細胞であり、HIV-1複製のモニターに用いた。MT4-GFP 細胞に対する HIV-1の増殖感染の結果、感染後約24時間で GFP の発現が認められた。8.4  $\mu$ M(検討した最高濃度)では、10又は50% 正常ヒト血清存在下で、グラゾプレビルによる測定可能な阻害活性は認められなかった。MT4細胞に対する明らかな細胞毒性も認められなかった。したがって、グラゾプレビルは HIV 重複感染患者には影響を及ぼさないと推測される。データを[表 2.6.2.A-24]に示す。

表 2.6.2.A-24 多重感染アッセイにおけるグラゾプレビルによる HIV 感染阻害

	MT4細胞での HIV 感染阻害 EC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	MT4細胞での 毒性アッセイ CC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>
陽性対照 b	0.79	≥980
グラゾプレビル	≥8400	≥8400

a 2回の測定の平均値

# 2.6.2.A.3.1.3.2 各種 HIV 治療薬との併用時のグラゾプレビルの活性

HIV・HCV 重複感染患者は一定数存在しており、両感染症に対する治療がしばしば同時に行われている[資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015] [2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。そこで、グラゾプレビルと既存の HIV 治療薬の併用による HIV 複製阻害活性の変化の有無を評価した。検討したグラゾプレビルの濃度は15 nM(ヒトでの100 mg 投与時の血漿中  $C_{\min}$ 値に相当)、100 nM(同じく  $C_{\max}$ 値に相当)及び500 nM(同じく  $C_{\max}$ の5倍値に相当)とした。100 nM の濃度において、マラビロクの  $EC_{50}$ 値は1.2倍(0.38±0.03から0.45±0.03 nM)に増加した(p=0.03)。他の HIV 治療薬の  $EC_{50}$ 値については、検討したすべての濃度のグラゾプレビル存在下で有意な変化は認められなかった(p>0.05)。データを[表 2.6.2.A-25]に示す。

表 2.6.2.A-25 各種 HIV 治療薬による HIV 複製阻害活性に対するグラゾプレビルの影響

		グラゾプレ	ビル濃度(nM)	
HIV 治療薬	0	15	100	500
		EC	<sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	
テノホビル	$91 \pm 12$	$91 \pm 24$	$89 \pm 23$	$84 \pm 22$
エムトリシタビン	$165 \pm 72$	$147 \pm 61$	$169 \pm 62$	$173 \pm 73$
エファビレンツ	$2.1 \pm 0.59$	$2.0 \pm 0.17$	$2.0 \pm 0.06$	$2.4 \pm 0.40$
リルピビリン	$2.4 \pm 0.42$	$2.3 \pm 0.36$	$2.7 \pm 0.70$	$2.3 \pm 0.50$
ダルナビル	$3.9 \pm 0.42$	$4.2 \pm 0.31$	$3.8 \pm 0.35$	$3.8 \pm 0.59$
アタザナビル	$5.9 \pm 0.96$	$4.6 \pm 0.35$	$4.4 \pm 0.40$	$4.8 \pm 0.85$
ラルテグラビル	$11 \pm 2.47$	$11 \pm 1.53$	$13 \pm 0$	$12 \pm 2.48$
ドルテグラビル	$12 \pm 2.15$	$11 \pm 3.52$	$14 \pm 0$	$11 \pm 2.52$
エンフビルチド	$9.2 \pm 0.04$	$9.36 \pm 1.12$	$8.8 \pm 1.13$	$7.95 \pm 1.78$
マラビロク b	$0.38 \pm 0.02$	$0.43 \pm 0.05$	$0.45 \pm 0.02$	$0.41 \pm 0.08$

a 平均値±標準偏差 (N≥3)

逆に、HCV GT1a レプリコン細胞でのグラゾプレビルの阻害活性に対する、各種 HIV 治療薬による影響を評価した。テノホビル、ジソプロキシル、リルピビリン、ラルテグラビル、アタザナビル及びエンフビルチドについては、ヒト血漿中  $C_{min}$  値、 $C_{max}$  値及び  $C_{max}$  値の5倍の濃度で、HCV

b 陽性対照には HIV-1非ヌクレオシド逆転写酵素阻害薬を用いた。

<sup>[2.6.3.</sup>A.1項] [資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011]

b 100 nM で MK-5172の活性は対照と有意差を示した (p値=0.03)。

<sup>[2.6.3.</sup>A.1項][資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015]

GT1a レプリコン細胞におけるグラゾプレビルの阻害活性に対する影響は認められなかった。エファビレンツ、エムトリシタビン、ダルナビル及びドルテグラビルについては、最大 $20~\mu M$ までの濃度で GT1a レプリコン細胞におけるグラゾプレビルの阻害活性に対する影響は認められなかった。データを[表 2.6.2.A-26]に示す。

表 2.6.2.A-26 各種 HIV 治療薬の臨床濃度でのグラゾプレビルの活性

FC 50 ± SD	Δ. VIII	<b>萨</b> ·	グラゾプレ	ビルの活性 <sup>a</sup>
薬物なし (対照)       0       0.25±0.11       0.78±0.23         アノホビル       1       0.23±0.08       0.64±0.10         3       0.30±0.21       0.63±0.32         エムトリシタビン <sup>b</sup> 6.6       0.17±0.02       0.70±0.23         エムトリシタビン <sup>b</sup> 6.6       0.16±0.05       0.60±0.11         20       0.17±0.11       0.63±0.18         エファビレンツ <sup>b</sup> 6.6       0.31±0.02       0.81±0.07         20       0.31±0.02       0.81±0.07         20       0.31±0.02       0.81±0.07         20       0.31±0.02       0.81±0.07         20       0.31±0.02       0.81±0.07         30.30±0.03       0.83±0.15       0.71±0.27         3       0.20±0.07       0.71±0.27         3       0.20±0.07       0.71±0.27         3       0.20±0.10       0.78±0.15         4       0.2       0.32±0.07       0.71±0.27         3       0.22±0.04       0.74±0.25         20       0.22±0.04       0.74±0.25         20       0.22±0.07       0.68±0.14         アタザナビル       3       0.25±0.07       0.70±0.29         10       0.18±0.04       0.53±0.12         3	HIV 治療薬		$EC_{50} \pm SD$	$EC_{90} \pm SD$
ファボビル 1 0.3 0.27±0.12 0.79±0.10 1 0.23±0.08 0.64±0.10 3 0.30±0.21 0.63±0.32 0.70±0.23 0.70±0.28 0.70±0.29 0.70±0.	一般名	濃度 (μM)	(nM)	(nM)
テノホビル 1 0.23 ± 0.08 0.64 ± 0.10 3 0.30 ± 0.21 0.63 ± 0.32 2.2 0.17 ± 0.02 0.70 ± 0.23 2.2 0.17 ± 0.02 0.70 ± 0.23 2.2 0.17 ± 0.02 0.70 ± 0.23 2.2 0.17 ± 0.01 0.63 ± 0.11 2.0 0.17 ± 0.11 0.63 ± 0.18 2.2 0.34 ± 0.30 0.79 ± 0.28 2.2 0.34 ± 0.30 0.79 ± 0.28 2.2 0.34 ± 0.30 0.79 ± 0.28 2.2 0.31 ± 0.01 1 1/a <sup>c</sup> 0.3 0.30 ± 0.03 0.83 ± 0.15 1/a 0.21 ± 0.07 0.71 ± 0.27 3 0.20 ± 0.10 0.78 ± 0.15 1/a 0.22 ± 0.04 0.74 ± 0.25 2.2 0.32 ± 0.11 0.82 ± 0.06 0.22 ± 0.04 0.74 ± 0.25 2.0 0.22 ± 0.10 0.71 ± 0.05 1/a 0.25 ± 0.07 0.70 ± 0.29 1/a 0.3 0.25 ± 0.07 0.70 ± 0.29 1/a 0.3 0.21 ± 0.14 0.67 ± 0.18 1/a 0.21 ± 0.15 0.74 ± 0.10 1/a 0.21 ± 0.15 0.74 ± 0.11 1/a 0.21 ± 0.15 0.74 ± 0.11 1/a 0.21 ± 0.15 0.74 ± 0.11 1/a 0.20 ± 0.14 0.70 ± 0.24 1/a 0.3 0.23 ± 0.15 0.72 ± 0.18 1/a 0.20 ± 0.14 0.70 ± 0.24 1/a 0.20 ± 0.14 0.67 ± 0.26 1/a 0.3 0.23 ± 0.15 0.72 ± 0.18 1/a 0.20 ± 0.14 0.67 ± 0.26 1/a 0.3 0.26 ± 0.26 0.69 ± 0.22 1/a 0.3 0.27 ± 0.14 0.81 ± 0.25 1/a 0.21 ± 0.15 0.72 ± 0.18 1/a 0.20 ± 0.14 0.67 ± 0.26 1/a 0.3 0.27 ± 0.14 0.81 ± 0.25 1/a 0.20 ± 0.14 0.61 ± 0.21 1/a 0.21 ± 0.15 0.72 ± 0.18 1/a 0.20 ± 0.14 0.67 ± 0.26 1/a 0.3 0.27 ± 0.14 0.81 ± 0.25 1/a 0.21 ± 0.15 0.72 ± 0.18 1/a 0.20 ± 0.14 0.67 ± 0.26 1/a 0.20 ± 0.14 0.61 ± 0.21 1/a 0.20 ± 0.14 0.61 ± 0.21 1/a 0.21 ± 0.15 0.72 ± 0.18 1/a 0.20 ± 0.14 0.67 ± 0.26 1/a 0.20 ± 0.14 0.61 ± 0.21 1/	薬物なし(対照)	0	$0.25 \pm 0.11$	$0.78 \pm 0.23$
3 0.30±0.21 0.63±0.32 2.2 0.17±0.02 0.70±0.23 エムトリシタビン <sup>b</sup> 6.6 0.16±0.05 0.60±0.11 20 0.17±0.11 0.63±0.18 2.2 0.34±0.30 0.79±0.28 エファビレンツ <sup>b</sup> 6.6 0.31±0.02 0.81±0.07 20 0.31±0.11 n/a <sup>c</sup> 0.3 0.30±0.03 0.83±0.15 リルピビリン 1 0.21±0.07 0.71±0.27 3 0.20±0.10 0.78±0.15 2.2 0.32±0.11 0.82±0.06 ダルナビル <sup>b</sup> 6.6 0.22±0.04 0.74±0.25 20 0.22±0.10 0.71±0.05 1 0.20±0.07 0.70±0.29 10 0.18±0.04 0.53±0.12 アタザナビル 3 0.25±0.07 0.70±0.29 10 0.18±0.04 0.53±0.12 フルアグラビル 1 0.21±0.15 0.74±0.10 3 0.28±0.18 0.87±0.11 アメデグラビル 5 6.6 0.19±0.03 0.73±0.24 ドルテグラビル 6.6 0.19±0.03 0.73±0.24 アクジェルク 0.3 0.23±0.15 0.72±0.18 マラビロク 1 0.20±0.14 0.67±0.28 アクジェルク 0.3 0.23±0.15 0.72±0.18 アクジェルク 1 0.20±0.14 0.67±0.26  0.3 0.27±0.14 0.81±0.25 エンフビルチド 1 0.19±0.14 0.61±0.21		0.3	$0.27 \pm 0.12$	$0.79 \pm 0.10$
	テノホビル	1	$0.23 \pm 0.08$	$0.64 \pm 0.10$
エムトリシタビン <sup>b</sup> 6.6 0.16±0.05 0.60±0.11 20 0.17±0.11 0.63±0.18 2.2 0.34±0.30 0.79±0.28  エファビレンツ <sup>b</sup> 6.6 0.31±0.02 0.81±0.07 20 0.31±0.11 n/a <sup>c</sup> 0.3 0.30±0.03 0.83±0.15  リルピビリン 1 0.21±0.07 0.71±0.27 3 0.20±0.10 0.78±0.15  2.2 0.32±0.11 0.82±0.06  ダルナビル <sup>b</sup> 6.6 0.22±0.04 0.74±0.25 20 0.22±0.10 0.71±0.05  アタザナビル 3 0.25±0.07 0.70±0.29 10 0.18±0.04 0.53±0.12  ラルテグラビル 1 0.21±0.15 0.74±0.10 3 0.28±0.18 0.87±0.11  フルテグラビル 1 0.21±0.15 0.74±0.10 3 0.28±0.18 0.87±0.11  2.2 0.24±0.14 0.70±0.24  ドルテグラビル 6.6 0.19±0.03 0.73±0.24  ドルテグラビル 1 0.20±0.14 0.70±0.24  マラビロク 1 0.20±0.14 0.67±0.26  3 0.23±0.15 0.72±0.18  マラビロク 1 0.20±0.14 0.67±0.26  3 0.26±0.26 0.69±0.22  エンフビルチド 1 0.19±0.14 0.81±0.25  エンフビルチド 1 0.19±0.14 0.61±0.21		3	$0.30 \pm 0.21$	$0.63 \pm 0.32$
		2.2	$0.17 \pm 0.02$	$0.70 \pm 0.23$
	エムトリシタビンb	6.6	$0.16 \pm 0.05$	$0.60 \pm 0.11$
エファビレンツ b 6.6 0.31±0.02 0.81±0.07 20 0.31±0.11 $n/a^c$ 0.3 0.30±0.03 0.83±0.15 $n/a^c$ 0.3 0.20±0.07 0.71±0.27 3 0.20±0.10 0.78±0.15 2.2 0.32±0.11 0.82±0.06 6.6 0.22±0.04 0.74±0.25 20 0.22±0.10 0.71±0.05 1 0.20±0.07 0.68±0.14 0.25±0.07 0.70±0.29 1 0.20±0.07 0.68±0.14 0.25±0.07 0.70±0.29 1 0 0.18±0.04 0.53±0.12 0.3 0.21±0.14 0.67±0.18 0.21±0.15 0.74±0.10 3 0.28±0.18 0.87±0.11 0.20±0.15 0.74±0.10 1 0.20±0.15 0.74±0.10 0.28±0.18 0.87±0.11 0.20±0.14 0.70±0.24 1 0.20±0.14 0.70±0.24 1 0.20±0.14 0.70±0.24 1 0.20±0.14 0.70±0.24 1 0.20±0.14 0.70±0.24 1 0.20±0.14 0.67±0.26 0.3 0.23±0.15 0.72±0.18 0.27±0.19 0.78±0.55 0.3 0.23±0.15 0.72±0.18 0.20±0.14 0.67±0.26 0.3 0.26±0.26 0.69±0.22 0.3 0.27±0.14 0.81±0.25 1 0.19±0.14 0.61±0.21 1 0.19±0.14 0.61±0.21		20	$0.17 \pm 0.11$	$0.63 \pm 0.18$
		2.2	$0.34 \pm 0.30$	$0.79 \pm 0.28$
リルピビリン $1$ $0.3$ $0.30 \pm 0.03$ $0.83 \pm 0.15$ $0.21 \pm 0.07$ $0.71 \pm 0.27$ $0.71 \pm 0.27$ $0.71 \pm 0.27$ $0.20 \pm 0.10$ $0.78 \pm 0.15$ $0.20 \pm 0.10$ $0.78 \pm 0.15$ $0.20 \pm 0.11$ $0.82 \pm 0.06$ $0.22 \pm 0.04$ $0.74 \pm 0.25$ $0.22 \pm 0.04$ $0.74 \pm 0.25$ $0.22 \pm 0.10$ $0.71 \pm 0.05$ $0.22 \pm 0.10$ $0.71 \pm 0.05$ $0.20 \pm 0.07$ $0.68 \pm 0.14$ $0.20 \pm 0.07$ $0.68 \pm 0.14$ $0.20 \pm 0.07$ $0.70 \pm 0.29$ $0.3$ $0.25 \pm 0.07$ $0.70 \pm 0.29$ $0.3$ $0.21 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.18$ $0.3$ $0.21 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.18$ $0.87 \pm 0.11$ $0.21 \pm 0.15$ $0.74 \pm 0.10$ $0.82 \pm 0.18$ $0.87 \pm 0.11$ $0.20 \pm 0.14$ $0.70 \pm 0.24$ ドルテグラビル $0.81 \pm 0.25$ $0.3$ $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ $0.3$ $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ $0.3$ $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ $0.3$ $0.26 \pm 0.26$ $0.69 \pm 0.22$ $0.3$ $0.27 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.26$ $0.3$ $0.27 \pm 0.14$ $0.81 \pm 0.25$ $0.3$ $0.27 \pm 0.14$ $0.81 \pm 0.25$ $0.3$ $0.27 \pm 0.14$ $0.81 \pm 0.25$	エファビレンツ b	6.6	$0.31 \pm 0.02$	$0.81 \pm 0.07$
リルピビリン         1 $0.21 \pm 0.07$ $0.71 \pm 0.27$ 3 $0.20 \pm 0.10$ $0.78 \pm 0.15$ 2.2 $0.32 \pm 0.11$ $0.82 \pm 0.06$ $6.6$ $0.22 \pm 0.04$ $0.74 \pm 0.25$ 20 $0.22 \pm 0.10$ $0.71 \pm 0.05$ 1 $0.20 \pm 0.07$ $0.68 \pm 0.14$ アタザナビル         3 $0.25 \pm 0.07$ $0.70 \pm 0.29$ 10 $0.18 \pm 0.04$ $0.53 \pm 0.12$ 0.3 $0.21 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.18$ ラルテグラビル         1 $0.21 \pm 0.15$ $0.74 \pm 0.10$ 3 $0.28 \pm 0.18$ $0.87 \pm 0.11$ 2.2 $0.24 \pm 0.14$ $0.70 \pm 0.24$ ドルテグラビル <sup>b</sup> 6.6 $0.19 \pm 0.03$ $0.73 \pm 0.24$ マラビロク         1 $0.20 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.26$ 3 $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ マラビロク         1 $0.20 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.26$ 3 $0.26 \pm 0.26$ $0.69 \pm 0.22$ 0.3 $0.27 \pm 0.14$ $0.81 \pm 0.25$ エンフビルチド         1 $0.19 \pm 0.14$		20	$0.31 \pm 0.11$	n/a <sup>c</sup>
		0.3	$0.30 \pm 0.03$	$0.83 \pm 0.15$
ダルナビル b $2.2$ $0.32 \pm 0.11$ $0.82 \pm 0.06$ $6.6$ $0.22 \pm 0.04$ $0.74 \pm 0.25$ $20$ $0.22 \pm 0.10$ $0.71 \pm 0.05$ $1$ $0.20 \pm 0.07$ $0.68 \pm 0.14$ $79 \pm 7 \pm 7 = 7 = 7 = 7 = 7 = 7 = 7 = 7 = 7$	リルピビリン		$0.21 \pm 0.07$	$0.71 \pm 0.27$
ダルナビル b 6.6 0.22 ± 0.04 0.74 ± 0.25 20 0.22 ± 0.10 0.71 ± 0.05 1 0.20 ± 0.07 0.68 ± 0.14 0.20 ± 0.07 0.68 ± 0.14 0.25 ± 0.07 0.70 ± 0.29 10 0.18 ± 0.04 0.53 ± 0.12 0.3 0.21 ± 0.14 0.67 ± 0.18 0.21 ± 0.15 0.74 ± 0.10 0.21 ± 0.15 0.74 ± 0.10 0.22 ± 0.14 0.70 ± 0.24 10 0.22 0.24 ± 0.14 0.70 ± 0.24 10 0.20 ± 0.17 ± 0.09 0.78 ± 0.55 0.3 0.23 ± 0.15 0.72 ± 0.18 0.3 0.26 ± 0.26 0.69 ± 0.22 0.3 0.27 ± 0.14 0.61 ± 0.21 0.25 10 0.19 ± 0.14 0.61 ± 0.21 0.25 10 0.19 ± 0.14 0.61 ± 0.21 0.25 0.26 0.29 ± 0.14 0.61 ± 0.21 0.25 0.26 0.29 ± 0.14 0.61 ± 0.21 0.25 0.26 0.26 0.26 0.26 0.26 0.26 0.26 0.26		3	$0.20 \pm 0.10$	$0.78 \pm 0.15$
		2.2	$0.32 \pm 0.11$	$0.82 \pm 0.06$
	ダルナビル b	6.6	$0.22 \pm 0.04$	$0.74 \pm 0.25$
アタザナビル 3 0.25 ± 0.07 0.70 ± 0.29 10 0.18 ± 0.04 0.53 ± 0.12 0.3 0.21 ± 0.14 0.67 ± 0.18 1 0.21 ± 0.15 0.74 ± 0.10 3 0.28 ± 0.18 0.87 ± 0.11 2.2 0.24 ± 0.14 0.70 ± 0.24 10.15 0.79 ± 0.24 10.16 10.17 ± 0.09 0.78 ± 0.55 0.3 0.23 ± 0.15 0.72 ± 0.18 10.20 ± 0.14 0.67 ± 0.26 10.20 ± 0.14 0.67 ± 0.26 10.20 ± 0.14 0.67 ± 0.26 10.20 ± 0.14 0.81 ± 0.25 10.19 ± 0.14 0.61 ± 0.21 10.19 ± 0.14 0.61 ± 0.		20	$0.22 \pm 0.10$	
			$0.20 \pm 0.07$	$0.68 \pm 0.14$
フルテグラビル $0.3$ $0.21 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.18$ $0.21 \pm 0.15$ $0.74 \pm 0.10$ $0.28 \pm 0.18$ $0.87 \pm 0.11$ $0.24 \pm 0.14$ $0.70 \pm 0.24$ ドルテグラビル $0.66$ $0.19 \pm 0.03$ $0.73 \pm 0.24$ $0.3$ $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ $0.3$ $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ $0.3$ $0.20 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.26$ $0.3$ $0.26 \pm 0.26$ $0.69 \pm 0.22$ $0.3$ $0.27 \pm 0.14$ $0.81 \pm 0.25$ $0.3$ $0.29 \pm 0.14$ $0.61 \pm 0.21$	アタザナビル	3	$0.25 \pm 0.07$	$0.70 \pm 0.29$
ラルテグラビル         1 $0.21 \pm 0.15$ $0.74 \pm 0.10$ 3 $0.28 \pm 0.18$ $0.87 \pm 0.11$ 2.2 $0.24 \pm 0.14$ $0.70 \pm 0.24$ ドルテグラビル b $6.6$ $0.19 \pm 0.03$ $0.73 \pm 0.24$ 20 $0.17 \pm 0.09$ $0.78 \pm 0.55$ 0.3 $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ マラビロク         1 $0.20 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.26$ 3 $0.26 \pm 0.26$ $0.69 \pm 0.22$ 0.3 $0.27 \pm 0.14$ $0.81 \pm 0.25$ エンフビルチド         1 $0.19 \pm 0.14$ $0.61 \pm 0.21$		10	$0.18 \pm 0.04$	$0.53 \pm 0.12$
3		0.3	$0.21 \pm 0.14$	$0.67 \pm 0.18$
ドルテグラビル b 2.2 $0.24 \pm 0.14$ $0.70 \pm 0.24$ $0.70 \pm 0.24$ $0.70 \pm 0.03$ $0.73 \pm 0.24$ $0.70 \pm 0.09$ $0.78 \pm 0.55$ $0.3$ $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ $0.20 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.26$ $0.20 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.26$ $0.20 \pm 0.14$ $0.20 \pm 0.22$ $0.3$ $0.27 \pm 0.14$ $0.20 \pm 0.21$ $0.19 \pm 0.14$ $0.20 \pm 0.21$	ラルテグラビル		$0.21 \pm 0.15$	$0.74 \pm 0.10$
ドルテグラビル b 6.6 $0.19 \pm 0.03$ $0.73 \pm 0.24$ $20$ $0.17 \pm 0.09$ $0.78 \pm 0.55$ $0.3$ $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ $1$ $0.20 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.26$ $3$ $0.26 \pm 0.26$ $0.69 \pm 0.22$ $0.3$ $0.27 \pm 0.14$ $0.81 \pm 0.25$ $1$ $1$ $1$ $1$ $1$ $1$ $1$ $1$ $1$ $1$		3	$0.28 \pm 0.18$	$0.87 \pm 0.11$
20 $0.17 \pm 0.09$ $0.78 \pm 0.55$ $0.3$ $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ $1$ $0.20 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.26$ $3$ $0.26 \pm 0.26$ $0.69 \pm 0.22$ $0.3$ $0.27 \pm 0.14$ $0.81 \pm 0.25$ エンフビルチド $1$ $0.19 \pm 0.14$ $0.61 \pm 0.21$		2.2	$0.24 \pm 0.14$	$0.70 \pm 0.24$
の.3 $0.23 \pm 0.15$ $0.72 \pm 0.18$ 1 $0.20 \pm 0.14$ $0.67 \pm 0.26$ 3 $0.26 \pm 0.26$ $0.69 \pm 0.22$ 0.3 $0.27 \pm 0.14$ $0.81 \pm 0.25$ エンフビルチド     1 $0.19 \pm 0.14$ $0.61 \pm 0.21$	ドルテグラビル <sup>b</sup>	6.6	$0.19 \pm 0.03$	$0.73 \pm 0.24$
マラビロク		20	$0.17 \pm 0.09$	$0.78 \pm 0.55$
	マラビロク	0.3	$0.23 \pm 0.15$	$0.72 \pm 0.18$
0.3 $0.27 \pm 0.14$ $0.81 \pm 0.25$ エンフビルチド         1 $0.19 \pm 0.14$ $0.61 \pm 0.21$		1	$0.20 \pm 0.14$	$0.67 \pm 0.26$
エンフビルチド 1 0.19 ± 0.14 0.61 ± 0.21		3	$0.26 \pm 0.26$	$0.69 \pm 0.22$
		0.3	$0.27 \pm 0.14$	$0.81 \pm 0.25$
3 $0.18 \pm 0.04$ $0.73 \pm 0.33$	エンフビルチド	1	$0.19 \pm 0.14$	$0.61 \pm 0.21$
		3	$0.18 \pm 0.04$	$0.73 \pm 0.33$

a SD は3回以上の独立した実験から算出した。

b 細胞毒性を避けるために、最高血漿中濃度の上限は20 μM とした。

c 該当なし(細胞毒性により活性の正確な測定が行えなかった)。

<sup>[2.6.3.</sup>A.1項] [資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015]

# 2.6.2.A.3.1.3.3 HBV 感染アッセイでのグラゾプレビルの活性

HepG2.2.15細胞を用いた B 型肝炎ウイルス(HBV)感染アッセイを行った。この肝芽腫由来の細胞株は HBV 株 ayw 遺伝子2コピーを含み、HBV を恒常的に産生する。抗 HBV アッセイではリアルタイム PCR (TagMan) を用いて、細胞外 HBV DNA コピー数を直接測定した (

にて実施)。検討した濃度(最大 $10\,\mu\text{M}$ )において、グラゾプレビルによる HBV 感染に対する影響は認められなかった[資料4.2.1.2.5: MK-5172A PD014] [2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項]。したがって、HBV 重複感染患者に対して、グラゾプレビルは影響を及ぼさないと推測された。データを[表2.6.2.A-27]に示す。

表 2.6.2.A-27 HBV 感染 HepG2.2.15 細胞におけるグラゾプレビルの活性

	HepG2.2.15細胞における	HepG2.2.15での細胞
	HBV 感染阻害	毒性アッセイ
	$EC_{50} (nM)^a$	$CC_{50} (nM)^a$
陽性対照 b	36.9	>10000
グラゾプレビル	>10000	>10000

a 2回の測定の平均値

### 2.6.2.A.4 安全性薬理試験

グラゾプレビルの心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対する作用を検討するために、ICH S7A 及び S7B ガイドラインに準拠した in vitro 及び in vivo 安全性薬理試験を実施した[表 2.6.2.A-28]。 実施した安全性薬理試験の一覧を薬理試験の概要表に示す[2.6.3.A.1項]。

b 陽性対照はヌクレオシドポリメラーゼ阻害薬とした。

<sup>[2.6.3.</sup>A.1項] [資料4.2.1.2.5: MK-5172A PD014]

# 表 2.6.2.A-28 グラゾプレビルの安全性薬理試験の概要

グラゾプレビルの安全性薬理試験			
	(ICH S7A 及び S7B ガイドライン準拠)		
試験番号 (GLP 適用の有無)	試験名	投与量	
TT # <b></b> -3064 (非 GLP)	哺乳類細胞に安定発現させた hERG (IKr)、hKCNQ1/hKCNE1 (IKs) 及びhNav1.5 (INa) 電流に対する作用	該当せず (in vitro 試験)	
TT #4721 (GLP)	CHO 細胞に安定発現させた hERG チャネル電流 における電気生理学的評価	該当せず (in vitro 試験)	
TT#5918 (非 GLP)	イヌ (麻酔下) の心血管系への影響を評価する 探索的試験	1, 2, 2 mg/kg (累積投与 量 = 5 mg/kg)	
TT #5651 (GLP)	イヌでの経口投与による心血管系及び呼吸系テレメトリー試験	5, 20, 600 mg/kg	
TT # -1152 (GLP)	機能観察総合評価(FOB)を含むラットの1ヵ月 間経口投与毒性試験	25, 50, 1000 mg/kg/ $\upbeta$ <sup>a</sup>	
TT #1120 (GLP)	機能観察総合評価を含むラットの1ヵ月間経口 投与毒性試験及び2週後の中間剖検	50, 200 mg/kg/日 <sup>a</sup> , 200 mg/kg b.i.d. <sup>b</sup>	
その他の試験 (バイオマーカー及び遺伝子発現)			
試験番号 (GLP 適用の有無)	試験名	投与量	
TT #9637 (非 GLP)	In Vivo 肝臓反応アッセイ	40, 200 mg/kg/ $\exists$ $^{\rm c}$	

- a FOB は投与第1日の投与後に実施した。
- b FOB は投与第1日の、1日2回投与の2回目の投与後(総1日投与量400 mg/kg)に実施した。
- c 7日間反復投与

b.i.d. = 1日2回投与、GLP = Good Laboratory Practice(医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準). [2.6.3.A.4項]

# 2.6.2.A.4.1 安全性薬理試験

2.6.2.A.4.1.1 哺乳類細胞に安定発現させた hERG ( $IK_r$ )、hKCNQ1/hKCNE1 ( $IK_s$ ) 及び hNav1.5 ( $IN_a$ ) 電流に対する作用

[資料4.2.1.3.1: TT# -3064]

哺乳類細胞に発現させた hERG カリウムチャネル( $IK_r$ )、心筋緩徐活性型遅延整流性カリウムチャネル( $IK_s$ )及び心筋細胞ナトリウムチャネル(hNav1.5)に対するグラゾプレビルの作用を検討した[資料4.2.1.3.1: TT# -3064] [2.6.3.A.4項]。この探索的試験においてグラゾプレビルは hERG 電流を抑制した( $IC_{50}$ 値:8.9  $\mu$ M、 $IC_{20}$ 値:3.5  $\mu$ M)。グラゾプレビルは hERG 末尾電流(tail current)を抑制したが、hERG ステップ電流を増大させ、複雑な作用プロファイルを示した。ただし、hERG 電流の  $IC_{50}$ 値及び  $IC_{20}$ 値が高いことから、この複雑な作用プロファイルは問題とはみなされず、それ以上の検討は行わなかった。検討された最高濃度(30  $\mu$ M)では  $IK_s$  又は  $IN_a$  に対する作用は認められなかった。

# 2.6.2.A.4.1.2 hERG 電流に対する作用

[資料4.2.1.3.2: TT# -4721]

標準的なホールセルパッチクランプ法を用いて、CHO-K1細胞に異種発現させた hERG チャネルに及ぼすグラゾプレビルの作用を検討した[資料4.2.1.3.2: TT# 4721] [2.6.3.A.4項]。その結果、グラゾプレビルは hERG 電流を抑制し、 $IC_{20}$ 値及び  $IC_{50}$ 値はそれぞれ $6.3~\mu$ M 及び $25~\mu$ M であった。 濃度依存的な抑制作用に加えて、hERG 電流の増強作用が $27\mu$ M 及び $96~\mu$ M の濃度(実測値)で認められた。これらの作用は先述したものと同様であった。本試験では、hERG 電流の阻害と増強の濃度反応がより明白に分離され、hERG 試験(GLP 対応)において生理学的温度で測定された場合よりも活性が低いことが異なる重要な点である。

# 2.6.2.A.4.1.3 イヌ (麻酔下) の心血管系に対する作用:探索試験

[資料4.2.1.3.4: TT# -5918]

麻酔下の人工呼吸管理下に迷走神経を切断した雑種のイヌ(雌3匹)を用いて、グラゾプレビル 1、2及び2 mg/kg を計3回連続的に30分間静脈内投与し、本剤の心血管系に及ぼす作用を検討した [資料4.2.1.3.4: TT# -5918] [2.6.3.A.4項]。溶媒には30%ヒドロキシプロピル  $\beta$  シクロデキストリン 溶液を使用した。各30分間の投与中を通して、心拍数、平均動脈圧、心電図パラメータ(PR、QRS 及び QT/QTc 間隔)に投与に関連した変化は認められなかった。1、2及び2 mg/kg を各30分間投与したときの血漿中グラゾプレビル濃度(平均値±標準偏差)はそれぞれ12.6±0.9、48.5±17.4及び 74.4±24.8  $\mu$ M であった。

#### 2.6.2.A.4.1.4 イヌ (覚醒下) の心血管系及び呼吸系に対する作用

[資料4.2.1.3.3: TT# -5651]

覚醒下のビーグル犬(雌雄各2匹)にグラゾプレビル5、20及び600 mg/kg 又は溶媒単独を単回強制経口投与し、グラゾプレビルの心血管系に及ぼす作用を検討した[資料4.2.1.3.3: TT# -5651] [2.6.3.A.4項]。溶媒には100%(w/w)ポリエチレングリコール400を使用した。投与後より約48時間にわたり、心拍数、動脈圧(収縮期、拡張期及び平均動脈圧)、心電図パラメータ(PR、QRS及びQT間隔)、体温、呼吸(速さ及び深さ)をテレメトリーにより測定し、QT間隔は個体毎に心拍数で補正した(QTc間隔)。

20及び600 mg/kg 群では、投与に関連した心拍数の増加(最大はそれぞれ+42 bpm [42%] 及び+32 bpm [30%])がみられ、同時に QT 間隔の短縮(最大はそれぞれ-17 msec [-7%] 及び-20 msec [-9%])が投与約3~20時間後にみられた。600 mg/kg 群では軽度の PR 間隔の短縮が投与5~12時間後(最大-8 msec [-9%])にわたりみられた。投薬に関連したその他の変化は認められなかった。本試験の心血管系での無作用量は5 mg/kg、呼吸系での無作用量は≥600 mg/kg であった。心血管系でみられた上記変化の程度は軽度のままであった。さらに、イヌを用いた1ヵ月間経口投与毒性試験(最大投与量600 mg/kg/日)において、心電図検査(ECG)又は組織形態学的検査における心血管系での変化は認められなかった[資料4.2.1.3.3: TT# -5651] [2.6.7.A.7F 項]。以上より、心血管系に対する無毒性量は600 mg/kg であった。



# 2.6.2.A.4.1.5 ラット経口投与時の機能観察総合評価

[資料4.2.3.2.4: TT# -1152]

ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験(グラゾプレビル25、50及び1000 mg/kg/日又は溶媒を強制経口投与)の投与初日の投与後に機能観察総合評価(FOB)を実施し、グラゾプレビルの中枢神経系への作用を検討した[資料4.2.3.2.4: TT# -1152] [2.6.3.A.4項]。溶媒には100%(w/w)ポリエチレングリコール400を使用した。雄ラット(各群6匹)の自律神経系機能、知覚/運動活性(ホームケージ及びオープンフィールド)、刺激反応性、覚醒/警戒性、体位及び歩行異常、前肢及び後肢の握力、着地時の後肢開脚幅、痛覚反応(ホットプレート法での反応潜時)、常同行動、自発運動及び体温について評価した。投与約2時間後(推定 T<sub>max</sub>)に FOB を実施した。投与に関連した変化は認められず、本試験における中枢神経系に対する無作用量は≥1000 mg/kg であった。

# 2.6.2.A.4.1.6 ラット経口投与時の機能観察総合評価

[資料4.2.3.2.6: TT# -1120]

グラゾプレビルの中枢神経系への作用を更に検討するために、新たなラットの1ヵ月間経口投与毒性試験の第1日目に機能観察総合評価(FOB)を実施した。グラゾプレビル50又は200 mg/kg の1日1回、並びに200 mg/kg の1日2回(約6時間間隔投与、総投与量400 mg/kg/日)又は[溶媒100%(w/w)ポリエチレングリコール400、1日2回、約6時間間隔投与]単独を強制経口投与した[資料4.2.3.2.6: TT# -1120] [2.6.3.A.4項]。本試験では、より高曝露によるグラゾプレビルの中枢神経系への作用を、最初の試験(TT # 1152) [2.6.3.A.4項]の結果と比較した。なお、1000 mg/kg(懸濁液)では物理的特性によりグラゾプレビルの吸収が制限され、溶解可能な最大量(200 mg/kg の1日2回投与)の投与後にグラゾプレビルの最大曝露が得られたことを [2.6.6.A.3.5項]に記載した。雄ラット(各群6匹)の自律神経系機能、知覚/運動活性(ホームケージ及びオープンフィールド)、刺激反応性、覚醒/警戒性、体位及び歩行異常、前肢及び後肢の握力、後肢開脚幅、痛覚反応(ホットプレート法での反応潜時)、常同行動、自発運動及び体温について評価した。50及び200 mg/kg/日群では初回投与の、また、200 mg/kg(1日2回投与)群では2回目投与の投与約2時間後(推定Tmax)に FOB を実施した。投与に関連した変化は認められず、本試験における中枢神経系に対する無作用量は≥200 mg/kg(1日2回投与)であった。

#### 2.6.2.A.4.2 その他の試験

### 2.6.2.A.4.2.1 In vivo 肝臓反応アッセイ

[資料4.2.1.3.5: TT# -9637]

探索的スクリーニングとして、Wistar Han ラット(各群雌5匹)に溶媒 [100% (w/w) ポリエチレングリコール400] 又はグラゾプレビル200 mg/kg/日(1日1回、7日間)を投与し、肝臓での生理学的又は病理学的機能に関連したパスウェイの変化を評価した[資料4.2.1.3.5: TT# -9637] [2.6.7.A.6項]。凍結肝臓サンプルから total RNA を抽出し、肝臓で発現している672の遺伝子についてグラゾプレビルに関連した発現変化を調べた。観察された遺伝子発現変化の程度より、グラ2.6.2 薬理試験の概要文



- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

ゾプレビルはラットの肝機能にほとんど影響を及ぼさないことが示された。

# 2.6.2.A.5 薬力学的薬物相互作用

グラゾプレビルの薬力学的薬物相互作用をみた in vivo 試験は実施していない。

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.B セクション B: エルバスビル

2.6.2.B.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.B.2.1 In Vitro 試験

2.6.2.B.2.1.1 阻害活性

[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002] [資料4.2.1.1.11: MK-8742 PD009] [資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003]

# 2.6.2.B.2.1.1.1 HCV レプリコンを用いた複製阻害活性

NS5A の活性は測定できないため、サブゲノムレプリコン細胞株のパネルを用いた3日間のレプリコンアッセイによりエルバスビルの活性を評価した。エルバスビルは HCV GT1a、GT1b、GT2a (31L)、GT3a、GT4a、GT5a 及び GT6に対して高い活性を示し、EC $_{50}$ 値は pM レベルであった[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][2.6.3.B.1項]。GT2b レプリコンに対するエルバスビルの活性はやや低く、EC $_{50}$ 値は3.4 nM であった。この低い活性の主な原因は GT2 NS5A 配列内の L31M 変異によるものと考えられる。公開データベース内の GT2配列を解析したところ、31M 変異は天然の GT2 感染例の中では高頻度に認められ、GT2a 又は GT2b 感染例の70%超に存在していた[資料4.2.1.1.11: MK-8742 PD009] [2.6.3.B.1項]。

また、40%正常ヒト血清存在下では、エルバスビルの活性に10倍程度の軽度シフトがみられた。 すべての genotype におけるエルバスビルの活性を[表 2.6.2.B-1]に示す。

レプリコン	$EC_{50} \pm SD^{a} (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
1a_H77	$0.004 \pm 0.002$	$0.006 \pm 0.002$
1a_H77 (40%NHS)	$0.040 \pm 0.013$	$0.082 \pm 0.027$
1b_con1	$0.003 \pm 0.001$	$0.006 \pm 0.004$
2a_JFH1	$0.003 \pm 0.001$	$0.019 \pm 0.010$
2b_AB030907/JFH1 <sup>b</sup>	$3.4 \pm 2.6$	$11 \pm 4.8$
3a_NC009824/con1 <sup>c</sup>	$0.030 \pm 0.010$	$0.120 \pm 0.060$
3a_S52_GU814263	$0.14 \pm 0.09$	$0.49 \pm 0.19$
4a_DQ418782/con1 <sup>c</sup>	$0.003 \pm 0.001$	$0.016 \pm 0.009$
4a_ED43_GU814265	$0.0003 \pm 0.0001$	$0.0005 \pm 0.0001$
5a_SA13_AF064490/JFH1 <sup>b</sup>	$0.001 \pm 0.001$	$0.002 \pm 0.002$
6_DQ278892/JFH1 <sup>b</sup>	$0.009 \pm 0.006$	$0.017 \pm 0.009$
6d D84263/JFH1 <sup>b</sup>	$0.003 \pm 0.002$	$0.008 \pm 0.005$

表 2.6.2.B-1 HCV GT1~6 レプリコンに対するエルバスビルの活性

- a 標準偏差(SD)は3回以上の独立した実験から算出した。
- b このレプリコンは JFH1株の GT2b、GT5a、GT6及び GT6d の NS5A 配列を有する。
- c これらのレプリコンは con1株の GT3a 及び GT4a の NS5A 配列を有する。

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002]

GT1の基準配列 (GT1a\_H77及び GT1b\_con1) で認められた活性に加えて、GT1の HCV 慢性感染患者由来の臨床分離株の多くに対し、エルバスビルの活性は EC50値で pM レベルであり、自然



- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

1b EU482860

発生する HCV の多くに対し広い活性を有することが示唆された。GT1患者におけるエルバスビル の活性を[表 2.6.2.B-2]に示す。

レプリコン  $EC_{50} (nM)^a$  $EC_{90} (nM)^a$ 1a H77 0.004 0.006 1a DQ889262 0.009 0.02 0.01 1a DQ889305 0.005 0.01 1a DQ889320 0.003 1a EU155348 0.003 0.01 1a EU155380 0.02 0.006 1b con1 0.003 0.01 1b AF033358 0.005 0.01 1b AJ32956 0.008 0.02 1b B9016 0.01 0.03

0.009

表 2.6.2.B-2 HCV GT1 患者由来分離株に対するエルバスビルの活性

GT2 患者の分離株に対するエルバスビルの EC50値は0.003~20 nM の広い範囲にわたった。これ は他の配列による何らかの影響の可能性もあるが、主として GT2b 患者の分離株に31M 変異が存 在するためと考えられる[表 2.6.2.B-3] [資料4.2.1.1.11: MK-8742 PD009] [2.6.3.B.1項]。

式 2.0.2.20 0 12 返日出於为龍州(10)(7) 0 = 70 0 0 12 12		
レプリコン細胞	$EC_{50} \pm SD^{a} (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
a_JFH (31L)	$0.003 \pm 0.001$	$0.019 \pm 0.01$
a JCH3 (31L)	0.3	3.3

表 2.6.2.B-3 GT2 患者由来分離株に対するエルバスビルの活性

レプリコン細胞	$EC_{50} \pm SD^{a} (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
GT2a_JFH (31L)	$0.003 \pm 0.001$	$0.019 \pm 0.01$
GT2a_JCH3 (31L)	0.3	3.3
GT2a_MD2a7 (31L)	0.03	0.2
GT2a_J6CH (31M)	20	38
GT2a_MD2a1 (31M)	15	35
$GT2b 0907 (31M)^b$	$3.4 \pm 2.6$	$11 \pm 4.8$

a 標準偏差 (SD) は3回以上の独立した実験から算出した。

GT3a 患者分離株からの複数の NS5A 配列を、GT2a JFH1株及び GT1b con1株レプリコン細胞に 組み込んだ。JFH1株では更に2種のレプリコンを作成できたが、con1株では作成できなかった。 エルバスビルの  $EC_{50}$ 値は、1つのコンストラクト(3a EU826291)で活性が<math>20倍シフトしたことを 除き、いずれの株でもおおむね3倍以内であった。すべてのレプリコンでエルバスビルの活性は nM レベル未満であり、その幅はいずれの株でも30倍という狭い範囲であった。これらの結果は、 エルバスビルが HCV GT3a 慢性感染患者に対して広い活性を示すことを示唆している。データを

0.03

a  $EC_{50}$ 値及び $EC_{90}$ 値は $2\sim3$ 回の独立した実験からの平均値とした。 [2.6.3.B.1項][資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002]

b このレプリコンは JFH1株の GT2b の NS5A 配列を有する。

<sup>[2.6.3.</sup>B.1項] [資料4.2.1.1.11: MK-8742 PD009]

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

[表 2.6.2.B-4]に示す。なお、これ以降はJFH1株を背景にキメラレプリコンを構築した。

表 2.6.2.B-4 HCV GT3 患者由来分離株に対するエルバスビルの活性

レプリコン	$\mathrm{EC}_{50}\left(\mathrm{nM}\right)^{*}$		$\mathrm{EC}_{90}\left(\mathrm{nM}\right)^{*}$	
	Con1	JFH1	Con1	JFH1
3a_GU814263	0.01	0.02	0.04	0.07
3a_GQ356207	0.01	0.02	0.02	0.03
3a_EU826291	0.002	0.04	0.005	0.10
3a_GQ300882	n/a <sup>a</sup>	0.33	n/a <sup>a</sup>	0.61
3a_GQ356215	n/a <sup>a</sup>	0.01	N/A <sup>a</sup>	0.02
3a_HM042077	0.004	0.01	0.01	0.03
3a_HM042078	0.003	0.01	0.01	0.03
3a_HQ912953	0.003	0.01	0.01	0.02
3a_AF320799	0.06	0.18	0.12	0.39

<sup>\* 2~3</sup>回の測定値の平均

[2.6.3.B.1項] MK-8742 PD002

GT3i 及び GT3g に対するエルバスビルの活性は低かった[表 2.6.2.B-5]。基準の3a\_S52\_GU814263に対し、GT3i 及び GT3g での活性は、それぞれ約1/100及び1/700未満であった。配列の違いは、他の遺伝子型において NS5A 阻害薬の耐性原因として知られている30位及び31位のアミノ酸残基の変異であった。[2.6.2.B.2.1.2.1項] [2.6.2.B.2.1.2.2項] [2.6.2.B.2.1.3.1項]。基準である GT3a\_S52では A30及び L31であるのに対して、GT3g では K30及び M31の2種類の RAV 候補が認められた。GT3i でみられた低い MK-8742活性では、R30が RAV 候補の可能性がある。ただし、他のアミノ酸変異の可能性も否定できない。

表 2.6.2.B-5 HCV GT3 のサブタイプに対するエルバスビルの活性

レプリコン	$EC_{50} \pm SD (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
3a_S52_GU814263	$0.14 \pm 0.09$	$0.49 \pm 0.19$
3g_JF735123 <sup>a</sup>	>100	>100
3i_JX227955 <sup>a</sup>	$17 \pm 2$	$61 \pm 16$

a JFH1株のGT3i及び3gのNS5A配列を有する。

標準偏差(SD)は3回以上の独立した実験から算出した。

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002]

GT4サブタイプは20種類以上と著しい多様性を示すことから、配列の入手可能性、RAV 候補の有無、世界的な罹患率、人種、疫学的特徴及び地域的分布に基づき、多数の患者の分離株から得られたサブタイプのアミノ酸配列を持つレプリコンを用いて、エルバスビルの活性を検討した。エルバスビルの活性は高く、その EC50値はおおむね pM 未満から nM レベルであった。これらはエルバスビルが GT4の HCV 感染患者に対して幅広く活性を示すことを示唆している。全サブタ2.6.2 薬理試験の概要文



a n/a = 該当なし

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

イプにおける活性を[表 2.6.2.B-6]に示す。

感受性の最も低い分離株4b\_FJ025855(EC $_{50}$ 値:34 nM)では、重要な3ヵ所(M28、S30、S93)でアミノ酸変異が認められ、基準株の ED43と比べて5ヵ所のヌクレオチド変異がこれらのアミノ酸変異には必要であった。また、分離株 GT4b\_FJ462435(EC $_{50}$ 値:3.6 nM)は基準配列と比べて3箇所のヌクレオチド変異が必要であった。これらのデータは、エルバスビルによる重大な耐性発現には、主要な RAV 部位での3ヵ所以上のヌクレオチド変異が必要であることを示唆している。以上より、GT4ではエルバスビルに対する耐性への遺伝的障壁が高いと考えられた。

<b>~</b>		
レプリコン <sup>a</sup>	$EC_{50} \pm SD (nM)^b$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
4a_GU814265	$0.0002 \pm 0.0001$	$0.0008 \pm 0.0001$
4a DQ418784	$0.0002 \pm 0.0001$	$0.0005 \pm 0.0002$
4b_FJ025854	$0.017 \pm 0.017$	$0.030 \pm 0.016$
4b_FJ025855	$34 \pm 23$	>100
4b_FJ462435	$3.6 \pm 2.3$	$6.2 \pm 3.8$
4d_DQ418786	$0.0005 \pm 0.0001$	$0.003 \pm 0.001$
4d EU392172	$0.0004 \pm 0.0001$	$0.0011 \pm 0.0002$
4f_EF589161	$0.0019 \pm 0.0014$	$0.018 \pm 0.028$
4g_JX227963	$0.0006 \pm 0.0002$	$0.0017 \pm 0.001$
4g JX227971	$0.072 \pm 0.035$	$0.25 \pm 0.13$
4m_FJ462433	$0.0004 \pm 0.0001$	$0.0024 \pm 0.0016$
4m_JX227972	$0.0007 \pm 0.0005$	$0.0043 \pm 0.0034$
4o_JX227977	$0.0022 \pm 0.001$	$0.016 \pm 0.011$
4q FH462434	$0.0005 \pm 0.0001$	$0.0014 \pm 0.0003$

表 2.6.2.B-6 GT4 サブタイプに対するエルバスビルの活性

公開データベースに登録されている GT5 NS5A 配列は少なく、現時点ではサブタイプ5a のみが確認されている[図 2.6.2.B-1]。入手可能な全 GT5a NS5A 患者分離株を基準配列である SA13\_v2 と共に JFH1株のレプリコン細胞に組み換えた。エルバスビルは1つを除き確立した配列全てに対し高い活性 (EC50値:1 pM 以下)を示した[表 2.6.2.B-7]。自然発生した GT2/GT5キメラウイルス (NS5A 配列は GT5由来)の配列に対するエルバスビルの活性は低かった。GT5a 患者由来の HCV RNA 配列の系統及び遺伝的距離の解析から、この GT2/GT5キメラウイルスの配列は、より耐性が高く系統学的に遠い分離配列 AM408911より、基準配列である AF064490 (SA13) との類縁性が高いことが明らかとなった[資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003] [2.6.3.B.1項]。したがって、GT5a 患者の分離株の一連の NS5A 配列に対し、エルバスビルは高い活性を示すと考えられた。

a JFH1株のGT4aのNS5A配列を有する。

b 平均値±標準偏差(SD)(N≥3)

<sup>[2.6.3.</sup>B.1項] [資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003]

表 2.6.2.B-7 GT5a 患者由来分離株に対するエルバスビルの活性

患者分離株	GenBank アクセッション 番号	$EC_{50} \pm SD (nM)^*$	$EC_{90} \pm SD (nM)^*$
SA13	AF064490 <sup>a</sup>	$0.0004 \pm 0.0002$	$0.0010 \pm 0.0002$
SA13_v2	AF064490 <sup>b</sup>	$0.0006 \pm 0.0003$	$0.002 \pm 0.002$
Pt_0409A008 <sup>c</sup>	n/a	$0.0010 \pm 0.0016$	$0.0018 \pm 0.002$
Pt_1209A010 <sup>c</sup>	n/a	$0.0005 \pm 0.0003$	$0.0009 \pm 0.0006$
Pt_1209A015 <sup>c</sup>	n/a	$0.0007 \pm 0.0006$	$0.0010 \pm 0.0012$
Pt_1209A018 <sup>c</sup>	n/a	$0.0007 \pm 0.0002$	$0.0012 \pm 0.0005$
Pt_1209A019 <sup>c</sup>	n/a	$0.0006 \pm 0.0005$	$0.0023 \pm 0.0015$
ZADGM869	KC767831	$0.0009 \pm 0.0007$	$0.0025 \pm 0.0017$
ZADGM1104	KC767833	$0.0010 \pm 0.0004$	$0.003 \pm 0.003$
ZADGM0518	KC767832	$0.0006 \pm 0.0001$	$0.0014 \pm 0.0008$
ZADGM2088	KC767829	$0.0004 \pm 0.0001$	$0.0007 \pm 0.0003$
R1	AM408911 <sup>d</sup>	$43 \pm 18$	$76 \pm 31$

- \* EC<sub>50</sub>/EC<sub>90</sub>±標準偏差 (SD) (N≥3)。全レプリコンは JFH1株の NS5A 配列を有する。
- a 参照細胞株
- b 他の GT5a 配列に用いた改善したプロトコルで再作成した基準細胞株。本細胞株の結果は、最適化された方法がエルバスビルの活性に影響しないこと示している。
- c GT5a 感染患者の血清(市販品)中の HCV RNA を増幅した。
- d 天然の genotype 間組み換え(GT2/GT5) ウイルス由来の NS5A 配列

n/a = 該当なし

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003]

GT6の NS5A 配列は多様性が高く、現在20を超えるサブタイプが認められている。配列の入手性、罹患率、人種及び地理的分布に基づき、多数のサブタイプに対応した数種の患者分離株を選択し、JFH1 株レプリコン細胞に組み換えた。NS5A 配列 DQ278982([表 2.6.2.B-8]中では太字フォントで表示)を有する基準細胞株を、最適化された方法により他の患者分離株と平行して再度構築し、改めて評価した。エルバスビルはこれらのスクリーニング細胞株 GT6\_DQ278892\_v2でも、以前と比較して同程度の活性を維持していた[表 2.6.2.B-8]。エルバスビルの活性(EC $_{50}$ 値)は最も感受性の高い GT6w から最も活性の低い GT6n まで0.002 ~2.7 nM の範囲であった。比較的感受性の低いサブタイプ(6m 及び6n)では、主要な NS5A RAV のアミノ酸位(28、30及び93位)で変異が認められたが、他の配列が影響している可能性もある。以上より、GT6の分離株では、エルバスビルの耐性発現に3ヵ所以上のヌクレオチド変異が必要であることが示唆され、耐性に対する遺伝的障壁が高いことが示された。

表 2628-8	GT6 サブタイプに対する	るエルバスヒルの活性 ゚

レプリコン	$EC_{50} \pm SD (nM)$	$EC_{90} \pm SD (nM)$
GT6_DQ278892	$0.011 \pm 0.004$	$0.023 \pm 0.008$
GT6_DQ278892_v2	$0.008 \pm 0.002$	$0.017 \pm 0.002$
GT6a_DQ480512	$0.02 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.10$
GT6a_AY859526	$0.53 \pm 0.42$	$0.97 \pm 0.59$
GT6d_D84263	$0.003 \pm 0.002$	$0.008 \pm 0.005$
GT6j_DQ835769	$0.004 \pm 0.003$	$0.008 \pm 0.005$
GT6m_DQ835763	$1.1 \pm 0.8$	$2.7 \pm 1.2$
GT6n_DQ835768	$2.7 \pm 0.7$	$6.2 \pm 4.0$
GT6u_EU408331	$0.016 \pm 0.005$	$0.049 \pm 0.018$
GT6v_EU798760	$0.35 \pm 0.15$	$1.2 \pm 0.26$
GT6w_EU643836	$0.002 \pm 0.001$	$0.005 \pm 0.003$

a 平均値±標準偏差 (N≥3)。すべてのレプリコンは JFH1株の NS5A 配列を有する。 [2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003]

#### 2.6.2.B.2.1.2 耐性型分析

[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002] [資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003] [資料4.2.1.1.11: MK-8742 PD009] [資料4.2.1.1.13: MK-5172A PD016] [資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010]

# 2.6.2.B.2.1.2.1 De Novo 耐性変異選択試験

GT1~3[表 2.6.2.B-9]及び GT4~6[表 2.6.2.B-10]に対する耐性選択を、野生型における  $EC_{90}$ 値の最大10000倍までの濃度で実施した。全般的に、エルバスビルの濃度上昇に伴い耐性コロニー数が減少した。予想されたとおり、生存コロニーはエルバスビルに対して耐性を示した。DMSO 処理細胞ではエルバスビルに対する感受性の変化はほとんど又はまったく認められなかった。アミノ酸変異は28、30、31及び93位で多くみられた。NS5A ドメイン II 及び III の変異も認められたが、本薬の作用に関わるのはドメイン I( $1\sim213$ 位)と考えられることから、それ以上の検討は行わなかった。観察された特定の genotype 及びサブタイプに特異的なドメイン I の新規変異も認められた。耐性選択試験で認められた RAV に対するエルバスビルの活性を、[表 2.6.2.B-11]及び[表 2.6.2.B-12]に示す。

#### 2.6.2.B.2.1.2.1.1 GT1a

耐性コロニー数の用量依存的な減少が認められた。生存細胞はエルバスビルに対して高い耐性を示した[表 2.6.2.B-9]。耐性コロニー由来の NS5A のクローン配列決定より、 $EC_{90}$ 値の1000倍の濃度のエルバスビルにより、Q30D 及び  $Q30D_{2}$  変異が選択された[表 2.6.2.B-9]。これらの変異では多くの単一変異よりも大きく活性が低下したが、アミノ酸変異を生じるためには $2\pi$  所 (Q30D) 又はそれ以上のヌクレオチド変異(連鎖した変異)が必要であり、エルバスビルに対する耐性の遺伝的障壁が高いことが示された。

## 2.6.2.B.2.1.2.1.2 GT1b

耐性コロニー数の用量依存的な減少が認められたが、選択されたコロニー数は同じ濃度で処理された GT1a レプリコン細胞のものよりも少なかった。L31F 及び Y93H 変異を伴う単一、二重及び三重の連鎖した変異が認められ、新規変異として V12II が認められた。V12II 変異レプリコンはエルバスビルに対する耐性を生じず、その存在は遺伝的浮動に寄与する可能性がある。耐性コロニー選択のデータ及び同定された変異を[表 2.6.2.B-9]に示す。

#### 2.6.2.B.2.1.2.1.3 GT2a

GT2a\_JFH (31L) では用量依存的な中等度のコロニー数減少が認められた[表 2.6.2.B-9]。集団配列解析により、エルバスビル処理により生じた耐性コロニーで F28S 及び F28Y 変異が検出された。JFH1レプリコンにおいて、F28S 及び F28Y 変異はそれぞれ0.019 nM~534 nM 及び0.73 nM の濃度でエルバスビルの活性 (EC $_{90}$ 値) 低下が認められた[表 2.6.2.B-11]。高度耐性変異である F28S の出現頻度は EC $_{90}$ 値の1倍で20%、100及び1000倍で100%であった[表 2.6.2.B-9]。これまでのところ、これらの RAV は臨床では認められていない。

### 2.6.2.B.2.1.2.1.4 GT2b

 $EC_{90}$ 値の100倍までの濃度で処理した  $GT2b\_0907$ (31M)では、コロニー数が非常に多く計測できなかったため、レプリコン細胞に対する耐性抑制が低いことが示された。処理後の細胞はエルバスビルに対して高い耐性を示した( $EC_{90}$ 値 >1000 nM)[表 2.6.2.B-9]。集団配列解析の結果、耐性コロニーの80%以上に Y93H 変異が認められた。既存の31M 耐性多型と連鎖した Y93H RAVにより、耐性コロニーに対するエルバスビルの活性に著しい低下が生じた。

#### 2.6.2.B.2.1.2.1.5 GT3a

 $EC_{90}$ 値の100及び1000倍の濃度のエルバスビル処理により、耐性コロニー数は顕著に減少した。 2種類の主要なアミノ酸変異(E92K 及びY93H)が同定された。GT3a Y93H 変異に対するエルバスビルの活性は野生型に対するのと比べて著しく低下した(約1/485)[表 2.6.2.B-9]。表現型解析のために E92K 変異を有する細胞を増殖させられず、このことからこの複製フィットネスが低いことが示唆された。



- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.B-9 GT1a、GT1b、GT2a、GT2b 及び GT3a レプリコン細胞での耐性コロニー選択

レプリコン	濃度	回復	$EC_{50}$	$EC_{90}$	EC <sub>90</sub>	亦田 8
細胞	EC <sub>90</sub> 倍数	コロニー数	(nM)	(nM)	倍率変化 <sup>a</sup>	変異 <sup>g</sup>
	1000倍	4	135	526	90000	Q30D, Q30D_Y93N
	100倍	56	5	15	3000	Y93N
GT1a-H77	10倍	204	2	11	2000	nd
	1倍	TMTC <sup>b</sup>	<2	<2	<300	nd
	DMSO	n/a	0.008	0.015	<3	n/a
	1000倍	3	27	120	20000	Y93H, L31F_Y93H_V121I
	100倍	5	n/a <sup>c</sup>	n/a <sup>c</sup>	n/a <sup>c</sup>	n/a <sup>c</sup>
GT1b-con1	10倍	38	0.6	12	2000	Y93H, V121I, Y93H_V121I
	1倍	122	0.2	1	200	Ү93Н
	DMSO	n/a	0.008	0.011	<3	n/a
	1000倍	220	706	911	45000	F28S (100%)
	100倍	350	475	827	40000	F28S (100%)
GT2a-JFH	10倍	TMTC	166	627	30000	F28Y (20%), F28S (60%)
	1倍	TMTC	nd <sup>e</sup>	47	2300	F28Y (40%), F28S (20%)
	DMSO	TMTC	< 0.2	< 0.2	<10	nd
	100倍	TMTC	>1000	>1000	>100	Y93H (100%)
GT2b-0907 <sup>d</sup>	10倍	TMTC	573	>1000	>100	Y93H (100%)
G120-0907	1倍	TMTC	551	>1000	>100	Y93H (80%)
	DMSO	TMTC	8	13	<1	nd
	1000倍	15	328	959	7000	Ү93Н
	100倍	23	245	518	7000	E92K, Y93H
GT3a/con1f	10倍	TMTC <sup>b</sup>	122	704	5000	E92K, Y93H
	1倍	$TMTC^b$	157	725	10000	E92K, Y93H
= a lb = += !!	DMSO	n/a <sup>c</sup>	0.2	0.8	6	n/a <sup>c</sup>

- a EC<sub>90</sub>値の変化:選択された細胞の EC<sub>90</sub>値/GT1a H77又は GT1b con1の EC<sub>90</sub>値
- b 過多のため計測不可(Too Many To Count; TMTC)
- c n/a=該当せず (細胞が増殖せず)
- d レプリコンは JFH1株の GT2b NS5A 配列を有する。
- e 測定せず
- f レプリコンは con1株の GT3a NS5A 配列を有する。
- g 耐性コロニーの集団配列決定から推定され、電気泳動のピークに基づき定量化された重要なアミノ酸変異 DMSO=ジメチルスルホキシド、n/a=該当なし、nd=検出せず
- [2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002] [資料4.2.1.1.11: MK-8742 PD009]

### 2.6.2.B.2.1.2.1.6 GT4a

GT4レプリコン細胞では、 $EC_{90}$ 値の30倍以下の濃度のエルバスビル処理により、耐性コロニー数の用量依存的な減少が認められた[表 2.6.2.B-10]。集団配列解析より、30、31及び93位のアミノ酸変異の頻度が高いことが明らかとなった。これらの変異に加えて、新たに N69K 変異も認められたが、この変異はエルバスビルに対する感受性に影響を及ぼさなかった。検討した最高濃度において全コロニーに L30S 変異が認められた。この L30S 変異によりエルバスビルの活性は1/5.4に低下した[表 2.6.2.B-10]。この変異は $2\pi$ のアクレオチド変異を必要とし、GT4でのエルバスビルに対する耐性の遺伝的障壁が高いことが示された。最高濃度で選択された耐性コロニーは DMSO 選択細胞と比べて40倍高い耐性を示した。ED43レプリコン細胞において、この変異はエル

2.6.2 薬理試験の概要文

バスビルの活性を1/1.5~1/15に低下させた。データを[表 2.6.2.B-11]に示す。

#### 2.6.2.B.2.1.2.1.7 GT5a

GT5a\_SA13のキメラレプリコン(JFH-1株)では、 $EC_{90}$ 値の100及び10,000倍の濃度で認められた耐性コロニー数は同程度であった。コロニーの集団配列解析の結果、これらの濃度では主に2ヵ所(L28F 及び L31F)の変異が認められた[表 2.6.2.B-10]。L31F 変異によりエルバスビルの活性は1/13,000に低下した。公開データベースに登録された GT5 NS5A 配列解析では、ベースライン時の31位の遺伝子多型は確認されていない。L31F 変異はエルバスビルに対して耐性を示し、L28F 変異に対するエルバスビルの活性低下の程度はわずか(約1/28)であった。データを[表 2.6.2.B-11]に示す。

#### 2.6.2.B.2.1.2.1.8 GT6

GT6キメラレプリコン (JFH-1株) を用いた耐性コロニー選択試験では、エルバスビル濃度の増加に伴った耐性コロニー数のわずかな減少が認められた[表 2.6.2.B-10]。コロニー全体の集団配列解析の結果、2ヵ所の主なアミノ酸変異 (F28S 及び L31F) が認められた。最高濃度により選択した耐性コロニー全体で、エルバスビルの活性は約1/20,000に低下した。F28S をコードする変異を有するレプリコンは増殖できず、おそらく複製フィットネスが低いためと考えられた。L31F 変異を組み込んだレプリコンでは、エルバスビルの活性が1/2000以下に低下した。

以上の de novo 耐性出現試験成績を要約すると、 $GT1\sim6\nu$ プリコンで選択された de novo 耐性コロニー数はエルバスビルの濃度上昇に伴い減少し、生存コロニーはエルバスビルに対して高い耐性を示した。集団配列解析の結果、耐性コロニーでは NS5A の特徴的な位置(28、30、31及び93位)での変異が認められた。GT1a、GT1b、GT4a 及び GT6での耐性獲得には2ヵ所以上のヌクレオチド変異が必要であり、これらの genotype におけるエルバスビルに対する耐性の遺伝的障壁が高いことが示された。GT2a で認められた F28S 耐性変異は臨床では観察されていない。GT2b では、31M 多型に Y93H 変異が加わることにより著しい活性低下が認められた。Y93H 変異は GT3a においても高度な耐性を示した。GT5a における L31F 変異は、エルバスビルの活性を著しく低下させた。

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

表	2.6.2.B-10 GT4a、	GT5a 及び	GT6 におけ	る耐性コロニー	·選択
---	------------------	---------	---------	---------	-----

レプリコン 細胞	濃度 (EC <sub>90</sub> 倍数)	耐性コロニー 数	プールした コロニーに 対する活性 EC <sub>90</sub> (nM)	倍率変化 (DMSO と の比較)	変異 <sup>d</sup>
	30倍	35	$0.02^{b}$	40	L30S
	10倍	144	0.017	34	L30F, L30P,
					M31V, N69K,
GT4a (ED43)					Y93H
	3倍	$TMTC^{a}$	0.003	6	L30F, M31V,
					Y93H
	1倍	TMTC	0.0004	0.8	ND
	10000倍	277	77	38500	L31F
GT5a (SA13) <sup>c</sup>	1000倍	321	24	12100	L31F
(AF064490)	100倍	423	14	7175	L28F, L31F
	10倍	TMTC	0.83	415	L28F, L31F
	1000倍	182	346	20353	F28S, L31F
GT6°	100倍	264	289	17000	F28S, L31F
(DQ278892)	10倍	>400	$\sim 100^{b}$	~5882	F28S
	1倍	TMTC	0.34	20	ND

- a コロニー過多のため計測不可(Too Many To Count; TMTC)
- b 近似值
- c JFH-1株のキメラレプリコン
- d 耐性コロニーの集団配列決定から推定され、電気泳動のピークに基づき定量化された重要なアミノ酸変異
- $GT4a EC_{90} = 0.5 pM$
- $GT5a EC_{90} = 1.7 pM$
- $GT6 EC_{90} = 17 pM$
- ND=検出せず
- [2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003]

### 2.6.2.B.2.1.2.2 NS5A 耐性変異(RAV)に対する活性変化: レプリコンアッセイ

多くの臨床試験、in vivo 及び in vitro 試験において、既知の NS5A 阻害薬に対して耐性を示す主要な変異が同定されており、主なものとして、28、30、31及び93位のアミノ酸残基の変異が認められている。これら変異の多くに対して、エルバスビルは活性を保持していた。GT1a と GT1b で同じ遺伝子座にある RAV では、GT1a の方で活性を大きく低下させた。検討した genotype のなかで、RAV L31F/M/V 及び RAV Y93H を NS5A 基準配列に組み換えると、エルバスビルの活性は低下した。データを[表 2.6.2.B-11]に示す。

表 2.6.2.B-11 GT1a、GT1b、GT2a、GT3a、GT4a、GT5a 及び GT6 の耐性変異に対するエルバスビルの活性

レプリコン	$EC_{50} \pm SD$	倍率変化	$EC_{90} \pm SD$	倍率変化
レノリコン	(nM)	(vs. WT)	(nM)	(vs. WT)
1a_H77 (WT)	$0.004 \pm 0.002$	1	$0.006 \pm 0.002$	1
1a M28V	$0.008 \pm 0.002$	2	$0.013 \pm 0.007$	2.2
1a Q30D	$3.7 \pm 1.7$	925	$8 \pm 3.5$	1333
1a Q30E	$0.1 \pm 0.07$	25	$0.15 \pm 0.03$	25
1a Q30H	$0.03 \pm 0.002$	7.5	$0.2 \pm 0.09$	33.3
1a Q30K	$0.006 \pm 0.003$	1.5	$0.059 \pm 0.014$	9.8
1a Q30R	$0.5 \pm 0.5$	125	$2.5 \pm 1.6$	417
1a L31F	$0.08 \pm 0.04$	20	$0.6 \pm 0.4$	100
1a L31M	$0.002 \pm 0.001$	0.5	$0.009 \pm 0.004$	1.5
1a L31V	$0.5 \pm 0.3$	125	$1.0 \pm 0.6$	167
1a Y93C	$0.2 \pm 0.07$	50	$1.1 \pm 0.3$	183
1a Y93H	$2.4 \pm 1.3$	600	$28 \pm 26$	4667
1a Y93N	8	2000	18	3000
1a Q30D/Y93N	180	45000	371	61833
1b con1 (WT)	$0.003 \pm 0.001$	1	$0.006 \pm 0.004$	1
1b L28M	$0.006 \pm 0.003$	2	$0.02 \pm 0.006$	3.3
1b L28V	$0.004 \pm 0.001$	1.3	$0.01 \pm 0.004$	1.7
1b R30Q	$0.009 \pm 0.003$	3	$0.02 \pm 0.007$	3.3
1b L31F	$0.05 \pm 0.02$	16.7	0.2	33.3
1b L31V	$0.01 \pm 0.01$	3.3	$0.07 \pm 0.03$	11.7
1b Q62E	0.007	2.3	0.012	2
1b L31V/Q62E	0.01	3.3	0.03	5
1b Y93C	$0.005 \pm 0.001$	1.7	$0.01 \pm 0.002$	1.7
1b Y93H	$0.05 \pm 0.03$	16.7	$0.4 \pm 0.2$	66.7
1b Q62E/Y93H	0.04	13.3	0.2	33.3

(続く)

# 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.B-11 GT1a、GT1b、GT2a、GT3a、GT4a、GT5a 及び GT6 の耐性変異に対する エルバスビルの活性(続き)

レプリコン	$EC_{50} \pm SD$	倍率変化	$EC_{90} \pm SD$	倍率変化
	(nM)	(vs. WT)	(nM)	(vs. WT)
2a_JFH1	$0.003 \pm 0.001$	1	$0.019 \pm 0.01$	1
2a L31M	$2.7 \pm 1$	900	$6.2 \pm 2.5$	326
2a F28S	$297 \pm 269$	99000	$534 \pm 271$	28105
2a F28Y	$0.28 \pm 0.27$	93	$0.73 \pm 0.47$	38
2a Y93H	$30 \pm 16$	10000	$78 \pm 38$	4105
3a_S52	$0.14 \pm 0.01$	1	$0.49 \pm 0.19$	1
3a A30D	$179 \pm 37$	1279	$294 \pm 70$	600
3a A30K	$7 \pm 1.7$	50	>10	>20
3a L31F	$20 \pm 2$	143	$45 \pm 8$	92
3a L31M	$46 \pm 13$	329	$76 \pm 16$	155
3a S62T	$0.07 \pm 0.03$	0.5	$0.22 \pm 0.04$	0.45
3a Y93H	$67.9 \pm 40$	485	$159 \pm 56$	324
4a_DQ418782	0.003	1	0.016	1
4a L30H	$0.72 \pm 0.28$	240	$2.39 \pm 0.97$	149
4a M31V	0.01	3.3	0.06	3.8
4a P32L	$0.014 \pm 0.01$	4.7	$0.045 \pm 0.01$	2.6
4a Y93H	0.069	23	0.25	15.6
4a_ED43	$0.0002 \pm 0.0001$	1	$0.0008 \pm 0.0001$	1
4a_ED43 L30F	$0.003 \pm 0.002$	15	$0.015 \pm 0.011$	19
4a_ED43 L30P	$0.0002 \pm 0.0001$	1	$0.0004 \pm 0.0002$	0.5
4a_ED43 L30S	$0.0008 \pm 0.0005$	4	$0.0043 \pm 0.0036$	5.4
4a_ED43 M31V	$0.0005 \pm 0.0004$	2.5	$0.0009 \pm 0.0007$	1.1
4a_ED43 N69K	$0.0003 \pm 0.0003$	1.5	$0.0003 \pm 0.00001$	0.4
4a_ED43 Y93H	$0.0015 \pm 0.002$	7.5	$0.0032 \pm 0.003$	4
5a_SA13	$0.001 \pm 0.001$	1	$0.002 \pm 0.002$	1
5a_SA13 L28F	$0.024 \pm 0.007$	24	$0.056 \pm 0.01$	28
5a_SA13 L31F	$13 \pm 3$	13000	$26 \pm 6$	13000
6_DQ278892	$0.022 \pm 0.013$	1	$0.052 \pm 0.03$	1
6_DQ278892 L31F	>17	>2000	>20	>1000

標準偏差(SD)は4回以上の独立した実験から算出した。太字フォントは野生型の配列を示す。WT=野生型

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][資料4.2.1.1.11: MK-8742 PD009]



なお、ここで用いたレプリコンアッセイの精度については、[2.6.2.A.2.1.2.1; 2.6.3.A.1; 2.6.3.B.1項] で述べたとおりである[資料4.2.1.1.13: MK-5172A PD016]。

#### 2.6.2.B.2.1.2.3 一過性導入ウイルスアッセイ

RAV 解析を迅速に処理するため、Huh7.5細胞を用いた一過性導入 GT1a ウイルスアッセイを構築し、従来の安定発現レプリコンアッセイと比較した[資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010][2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。一過性導入ウイルスアッセイでのエルバスビルの  $EC_{50}$ 値は、安定発現レプリコンアッセイでの値のおおむね3倍以内であり、外れ値はほとんどなかった[資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。一過性導入ウイルスアッセイでの GT1a RAV に対するエルバスビルの活性を[表 2.6.2.B-12]に示す。安定発現レプリコンアッセイで認められていた R81の変異は、エルバスビルの活性に影響しなかった。同じゲノム上の複数 RAV により大幅な活性低下がみられ、3ヵ所のアミノ酸変異(検討した最大数)によりエルバスビルの活性に最大の低下がみられた。一過性導入ウイルスアッセイは迅速であり、安定発現レプリコンアッセイでは困難なフィットネスの低い RAV を評価できるため、臨床試験時における GT1a RAV 表現型解析の際には、この一過性導入ウイルスアッセイを用いた。

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.B-12 GT1a NS5A RAV に対するエルバスビルの活性: 一過性導入ウイルスアッセイ

			_
変異	$EC_{50} \pm SD (nM)^a$	倍率変化 (vs. WT)	相対的フィットネスb
WT	$0.007 \pm 0.004$	1	1
M28A	$0.427 \pm 0.22$	61	0.16
M28G	$500 \pm 54$	71429	0.17
M28T	$0.108 \pm 0.03$	15	0.78
M28V	$0.01 \pm 0.01$	1	1.03
Q30D	NT	NT	不適応
Q30E	$0.394 \pm 0.02$	56	0.85
Q30G	0.067	10	0.85
Q30H	$0.044 \pm 0.03$	6	1.3
Q30K	$0.432 \pm 0.13$	62	0.81
Q30L	$0.006 \pm 0.002$	1	0.17
Q30R	$0.114 \pm 0.009$	16	0.80
L31F	$0.67 \pm 0.38$	96	0.8
L31M	$0.07 \pm 0.03$	10	1.5
L31V	$0.43 \pm 0.13$	61	0.85
H58D	$0.041 \pm 0.02$	6	0.86
R81M	$0.005 \pm 0.005$	1	1.28
R81S	$0.005 \pm 0.004$	1	0.44
R81W	$0.008 \pm 0.005$	1	0.66
A92P	$0.008 \pm 0.003$	1	0.75
Y93C	$0.08 \pm 0.004$	11	0.3
Y93F	$0.012 \pm 0.012$	2	0.45
Ү93Н	$1.54 \pm 0.78$	220	0.2
Y93N	$6.5 \pm 1.25$	929	0.5
M28A_Q30H	$10 \pm 1$	1429	0.40
M28T_Q30H	$16 \pm 1$	2286	0.70
Q30H_L31V	$10 \pm 1$	1429	1.10
Q30R_L31F	$39 \pm 2$	5571	0.93
Q30R_L31V	$50 \pm 10$	7143	1.1
Q30R_A92P	$0.2 \pm 0.14$	29	0.53
L31V_Y93H	$272 \pm 115$	38857	0.50
L31V_Y93N	$375 \pm 145$	53571	0.51
K24T_M28T_Q30R	49	7000	1.15
K24Q_M28T_L31M	0.06	9	0.41
K24M_Q30R_R81M	$0.48 \pm 0.01$	69	1.0
M28A_Q30H_L31V	$154 \pm 7$	22000	0.25
M28T_Q30H_L31V	$392 \pm 34$	56000	0.16
M28T_Q30R_L31V	$624 \pm 97$	89143	0.69
M28V_Q30H_L31V	$17 \pm 5$	2429	0.83
M28T_Q30R_L31V_Y93H	5000	714286	0.22

a 平均値(N=1~3)

b フィットネスの範囲: ≤0.02 = 不適応、0.03~0.5 = 中程度、>0.5 = 適応

NT = ウイルスが不適応のため試験を行わず、SD = 標準偏差

<sup>[2.6.3.</sup>B.1項] [資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010]

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

## 2.6.2.B.2.1.3 交差耐性

[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003][資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010]

他の HCV 直接作用型抗ウイルス薬(DAA)に対する交差耐性の可能性を評価するため、これらの阻害薬に特徴的な RAV のレプリコンに対するエルバスビルの活性を検討した。ほとんどの RAV が GTIで報告・確認されていることから、この genotype を交差耐性試験のモデルとして用いた。検討した RAV のいずれに対してもエルバスビルの活性低下は認められなかったことから、交差耐性の可能性は考え難いことが示された[表 2.6.2.B-13]。エルバスビルは、他の DAA の RAV に対して野生型に対するものと同様の活性を維持しており、これらのクラスの薬物が無効な患者に対する治療選択肢になる可能性が考えられた。

表 2.6.2.B-13 HCV 直接作用型抗ウイルス剤の RAV に対するエルバスビルの活性

Genotype	阻害薬のクラス	変異	$EC_{50} \pm SD (pM)^a$
		WT	$1.0 \pm 0.6$
		T54S	$0.5 \pm 0.1$
	NS3 PI	Q80K	$0.7 \pm 0.3$
	NS3 P1	R155K	$0.4 \pm 0.1$
1a (H77)		V36M_R155K	$0.9 \pm 0.8$
		D168V	$1.1 \pm 0.5$
		C316Y	$0.9 \pm 0.3$
	NS5B NNI	M414I	$1.0 \pm 0.4$
		M423T	$0.6 \pm 0.4$
		WT	$0.7 \pm 0.3$
	NS3 PI	A156T	$1.5 \pm 1.3$
11. ( 1)	NS3 F1	A156V	$1.5 \pm 0.9$
1b (con 1)		D168Y	$0.9 \pm 0.2$
	NS5B NI	S282T	$0.3 \pm 0.1$
	NS5B NNI	P495L	$2.2 \pm 1.0$

a  $EC_{50}\pm SD \ (N \ge 4)$ 

NI = ヌクレオチドポリメラーゼ阻害薬、NNI = 非ヌクレオチド阻害薬ポリメラーゼ、PI = プロテアーゼ阻害  $\bar{\mathbf{x}}$ 

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003]

### 2.6.2.B.2.1.3.1 NS5A RAV に対する交差耐性

臨床でみられた GT1a RAV に対するエルバスビル並びに他の NS5A 阻害薬(レディパスビル及びオムビタスビル)の活性を評価した[資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010][2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。評価には一過性導入ウイルスアッセイを用いた。エルバスビルが最も強力な阻害薬であり、NS5A RAV に対するエルバスビルの活性の倍率変化は、レディパスビル及びオムビタスビルより小さかった。NS5A 阻害薬での最大の活性低下が Y93H/N 変異でみられた。データを[表 2.6.2.B-14]に示す。

SD = 標準偏差、WT = 野生型

表 2.6.2.B-14 GT1a NS5A RAV に対する HCV NS5A 阻害薬の活性:一過性導入ウイルスアッセ

イ

	エルバス	ビル	レディパス	スビル	オムビタス	ビル
変異	$EC_{50} \pm SD^{a}$ (nM)	倍率変化	$EC_{50} \pm SD^{a}$ (nM)	倍率変化	$EC_{50} \pm SD^{a}$ (nM)	倍率変化
WT	$0.013 \pm 0.008$	1.0	$0.068 \pm 0.03$	1.0	$0.12 \pm 0.08$	1.0
M28A	$0.49 \pm 0.25$	38.7	$17.4 \pm 8.1$	257.1	$40.3 \pm 24.0$	330.3
M28T	$0.21 \pm 0.08$	16.9	$2.0 \pm 0.3$	30.2	$210.5 \pm 60.1$	1723.8
M28V	$0.019 \pm 0.009$	1.5	$0.04 \pm 0.02$	0.6	$6.7 \pm 3.3$	55.0
Q30E	$0.52 \pm 0.09$	41.1	$65.0 \pm 8.0$	962.2	$41.0 \pm 13.1$	335.8
Q30H	$0.05 \pm 0.02$	3.6	$6.9 \pm 2.5$	101.9	$1.0 \pm 0.1$	7.9
Q30K	$0.47 \pm 0.5$	37.3	$32.3 \pm 10.9$	478.1	$21.3 \pm 12.3$	178
Q30L	$0.006 \pm 0.002$	0.5	$0.7 \pm 0.2$	10.3	0.1*	0.8*
Q30R	$0.23 \pm 0.12$	18.2	$9.5 \pm 2.1$	140.6	$80.5 \pm 17.7$	659.2
L31M	$0.12 \pm 0.03$	9.4	$10.1 \pm 4.3$	149.5	$0.3 \pm 0.2$	2.1
L31V	$0.82 \pm 0.5$	65.4	$18.7 \pm 8.1$	276.3	$5.9 \pm 4.2$	48.0
H58D	$0.07 \pm 0.01$	5.8	$25.7 \pm 13.3$	379.9	$15.1 \pm 10.0$	123.7
H58P	$0.012 \pm 0.004$	1.0	$0.1 \pm 0.01$	1.4	$0.12 \pm 0.03$	1.0
Y93C	$0.19 \pm 0.09$	14.9	$18.0 \pm 1.0$	266.4	$76.0 \pm 20.9$	622.4
Y93N	$6.8 \pm 2.3$	538.9	$342.3 \pm 89.8$	5067.4	$1421 \pm 689$	11637.0
Y93H	$3.3 \pm 1.8$	258.8	$98.0 \pm 48.4$	1450.7	$1138.0 \pm 332.3$	9319.4

<sup>\*</sup> N=1

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010]

臨床で認められた GT1b NS5A RAV に対するエルバスビル並びに既存の NS5A 阻害薬(レディパスビル及びオムビタスビル)の活性を評価した[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][2.6.3.B.1項]。変異のうち L31V が NS5A 阻害薬の最も顕著な活性低下を生じた。NS5A RAV に対する阻害活性はエルバスビルが最も高かった。データを[表 2.6.2.B-15]に示す。

a 平均値±標準偏差(SD)(N≥3)

WT=野生型、野生型からの倍率変化

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

	エルバスビル		レディパスビル		オムビタスビル	
レプリコン	$EC_{50} \pm SD^b$	倍率	$EC_{50} \pm SD^b$	倍率	$EC_{50} \pm SD^{b}$	倍率
	(nM)	変化 a	(nM)	変化 a	(nM)	変化 a
GT1b_Con1						
(WT)	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.0004 \pm 0.0003$	1.0	$0.001 \pm 0.001$	1.0
L31I	$0.0011 \pm 0.0004$	1.1	$0.052 \pm 0.012$	130	$0.003 \pm 0.002$	3
L31M	$0.007 \pm 0.007$	7.0	$0.03 \pm 0.01$	75	$0.006 \pm 0.001$	6
L31V	$0.013 \pm 0.007$	13	$0.95 \pm 0.87$	2375	$0.71 \pm 0.37$	710

a WT に対する倍率変化

結果は3回以上の独立した測定による。太字フォントは後続の変異を組み込んだWT配列を示す。

WT=野生型

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002]

### 2.6.2.B.2.1.3.2 NS3 RAV に対する交差耐性

臨床で認められた GT1 NS3 RAV のパネルを用いてエルバスビル並びに既存の NS5A 阻害薬(レディパスビル及びオムビタスビル) の活性を評価した。GT1a 又は GT1b の NS3 RAV では、いずれも NS5A 阻害薬による活性の低下がみられなかった[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002] [2.6.3.B.1 項]及び[資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010] [2.6.3.B.1項及び2.6.3.A.1項]。データを[表 2.6.2.B-16]に示す。

表 2.6.2.B-16 GT1 NS3 RAV に対する HCV NS5A 阻害薬の活性

	エルバスビル	レ	レディパスビル		オムビタスビル	
レプリコン	$EC_{50} \pm SD (nM)$	倍率 変化	$EC_{50} \pm SD (nM)$	倍率 変化	$EC_{50} \pm SD (nM)$	倍率 変化
GT1a_H77S (WT)	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.02 \pm 0.01$	1.0	$0.04 \pm 0.04$	1.0
V36A <sup>c,d</sup>	$0.001 \pm 0.0003$	1.0	$0.007 \pm 0.004$	0.4	$0.02 \pm 0.01$	0.5
T54S <sup>c,d</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.3	$0.02 \pm 0.01$	1.0	$0.04 \pm 0.032$	1.0
V55I	$0.002 \pm 0.001$	2.0	$0.02 \pm 0.008$	1.0	$0.03 \pm 0.02$	0.8
Y56H	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.01 \pm 0.01$	0.5	$0.03 \pm 0.02$	0.8
Q80K <sup>a</sup>	$0.001 \pm 0.0003$	1.0	$0.01 \pm 0.01$	0.5	$0.02 \pm 0.01$	0.5
S122R <sup>a,d</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.01 \pm 0.01$	0.5	$0.02 \pm 0.01$	0.5
$I132V^{T}$	$0.006 \pm 0.003$	0.5	$0.054 \pm 0.025$	0.8	$0.12 \pm 0.096$	0.9
R155K <sup>a,b,c,d,e</sup>	$0.0004 \pm 0.0004$	0.4	$0.01 \pm 0.004$	0.5	$0.003 \pm 0.002$	0.1
A156S <sup>c,d</sup>	$0.001 \pm 0.0004$	1.0	$0.01 \pm 0.01$	0.5	$0.02 \pm 0.02$	0.5
D168A <sup>a,b,d</sup>	$0.0001 \pm 0.0001$	0.2	$0.004 \pm 0.005$	0.2	$0.003 \pm 0.0001$	0.1
D168E <sup>a,b,e,f</sup>	$0.0002 \pm 0.0001$	0.3	$0.01 \pm 0.003$	0.5	$0.01 \pm 0.004$	0.3
D168N <sup>c</sup>	$0.0003 \pm 0.0003$	0.4	$0.01 \pm 0.003$	0.5	$0.002 \pm 0.001$	0.1
D168Y <sup>e</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.01 \pm 0.002$	0.5	$0.01 \pm 0.004$	0.3
I170T <sup>c,e</sup>	$0.0004 \pm 0.0002$	0.3	$0.01 \pm 0.002$	0.5	$0.02 \pm 0.01$	0.5

(続く)

b 平均値±標準偏差 (SD) (N≥3)

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2.B-16 GT1 NS3 RAV に対する HCV NS5A 阻害薬の活性 (続き)

	エルバスビル	V	レディパスビル		オムビタスビル	
レプリコン	$EC_{50} \pm SD (nM)$	倍率 変化	$EC_{50} \pm SD (nM)$	倍率 変化	$EC_{50} \pm SD (nM)$	倍率 変化
GT1b_Con1 (WT)	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.0004 \pm 0.0003$	1.0	$0.001 \pm 0.001$	1.0
V36A <sup>c,d</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.0004 \pm 0.0001$	1.0	$0.001 \pm 0.001$	1.0
T54S <sup>c,d</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.0004 \pm 0.0002$	1.0	$0.001 \pm 0.001$	1.0
V55A <sup>c</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.001 \pm 0.0003$	2.5	$0.002 \pm 0.001$	2.0
Y56H	$0.0003 \pm 0.0002$	0.4	$0.0003 \pm 0.0001$	0.8	$0.001 \pm 0.0003$	1.0
Q80R	$0.001 \pm 0.0004$	1.0	$0.001 \pm 0.0004$	2.5	$0.001 \pm 0.001$	1.0
A156T <sup>c,d</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.001 \pm 0.0001$	2.5	$0.001 \pm 0.001$	1.0
D168A <sup>a,b,d,e,f,g</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.001 \pm 0.0002$	2.5	$0.001 \pm 0.001$	1.0
D168E <sup>c,e,f,h</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.0004 \pm 0.0004$	1.0	$0.001 \pm 0.001$	1.0
D168N <sup>c</sup>	$0.0003 \pm 0.001$	0.3	$0.0004 \pm 0.0002$	1.0	$0.001 \pm 0.001$	1.0
D168V <sup>a,d,e,f,g,h</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.001 \pm 0.001$	2.5	$0.001 \pm 0.001$	1.0
V170A <sup>a,c,d</sup>	$0.001 \pm 0.001$	1.0	$0.001 \pm 0.001$	2.5	$0.001 \pm 0.001$	1.0

- a シメプレビルの臨床試験で同定された RAV
- b グラゾプレビルの第Ⅱ相臨床試験で同定された RAV
- c ボセプレビルの臨床試験で同定された RAV
- d テラプレビルの臨床試験で同定された RAV
- e アスナプレビルの臨床試験で同定された RAV
- f ファルダプレビルの臨床試験で同定された RAV
- g バニプレビルの臨床試験で同定された RAV
- h ソバプレビルの臨床試験で同定された RAV
- T=GT1a一過性導入ウイルスアッセイでの検討により I132V に対する活性を推定。

WT=野生型、野生型に対する倍率変化

3回以上の独立した測定による結果 (EC<sub>50</sub>±標準偏差)。太字フォントは後続の変異を組み込んだ WT 配列を示す。 [2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002] [資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010]

交差耐性評価の一環として、エルバスビル及びグラゾプレビル(NS3/4A プロテアーゼ阻害薬)による HCV RNA 減少の動態を、NS3及び NS5A RAV で認められた RAV について評価した。その結果、1つの種類の阻害薬でみられる RAV は、他の種類の阻害薬での RNA 減少速度に影響しないことが明らかとなった [図 2.6.2.B-1]。GT1a でみられた NS3 RAV(R155K)を有するレプリコンにおけるエルバスビル(NS5A 阻害薬)による HCV RNA 減少の動態は、野生型(WT)GT 1aレプリコンと同様であった [図 2.6.2.B-1A]。同様に、NS5A RAV(Q30D、Y93H)を有するレプリコンにおけるグラゾプレビル(NS3阻害薬)による HCV RNA 減少の動態は、野生型 GT 1aレプリコンと同様であった [図 2.6.2.B-1B]。したがって、認められた NS5A RAV は NS3プロテアーゼ阻害薬の活性及びウイルス RNA 減少速度に影響せず、その逆もまた同様であった。

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

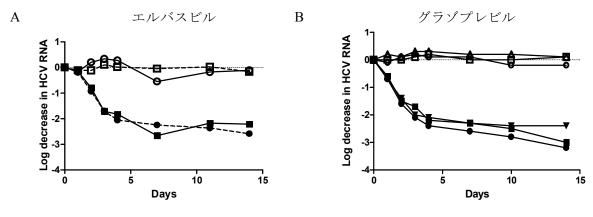


図 2.6.2.B-1 GT1a レプリコンに対する HCV RNA 減少パターン

- (A) DMSO (白) 及びエルバスビル6 pM (黒) の14日間処置による GT1a\_R155K (□,■) 及び野生型 GT1a (○, ●) の7日は
- ●) の阻害
- (B) DMSO(白)及びグラゾプレビル15 nM(黒)の14日間処置による Q30D( $\square$ ,  $\blacksquare$ )、Y93H( $\nabla$ ,  $\blacktriangledown$ )及び野生型 GT1a( $\bigcirc$ ,  $\blacksquare$ )の阻害

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003]

# 2.6.2.B.2.1.3.3 エルバスビル耐性変異に対するプロテアーゼ阻害薬及びポリメラーゼ 阻害薬の活性

NS3プロテアーゼ阻害薬及び NS5B ポリメラーゼ阻害薬の NS5A 耐性変異に対する活性を評価 した[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002] [2.6.3.B.1項]。プロテアーゼ阻害薬又はポリメラーゼ阻害薬の いずれにも交差反応は認められなかった[表 2.6.2.B-17]。

表 2.6.2.B-17 エルバスビル耐性変異に対するプロテアーゼ阻害薬及びポリメラーゼ阻害薬の活性

レプリコン	プロテアーゼ阻害薬 (Compound 771647 <sup>a</sup> )		ヌクレオシドポリメラーゼ阻害 (Compound 0608 <sup>b</sup> )		
	EC <sub>50</sub> (nM)	EC <sub>90</sub> (nM)	EC <sub>50</sub> (nM)	$EC_{90}(nM)$	
1a_H77 (WT)	39	78	715	2043	
1a Q30E	23	74	732	2428	
1a Q30D	38	64	618	1603	
1a Q30K	34	63	698	1936	
1a L31V	60	111	1299	2723	
1a Y93H	35	96	1143	3945	
1a Y93N	32	54	891	2406	

WT=野生型

a,b いずれも Merck で合成された前臨床レベルのリード化合物

[2.6.3.B.1項][資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002]

### 2.6.2.B.2.1.4 併用試験

[資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008][資料4.2.1.1.14: MK-5172A PD017] [資料4.2.1.1.12: MK-2248A PD001]

### 2.6.2.B.2.1.4.1 エルバスビル及びグラゾプレビルの併用試験:GT1aレプリコン細胞

GT1a レプリコン細胞を用い、エルバスビル及びグラゾプレビル (NS3/4A プロテアーゼ阻害薬) の併用による抗ウイルス活性を評価した[資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。 いずれの濃度の組合せにおいても細胞毒性は認められなかった。抗ウイルスデータの解析にはコンピュータソフトウェア MacSynergy II による自動解析を用いた。この解析では、HCV RNA 阻害率(%)と TaqMan 解析から実験的に求めた直接閾値サイクル数(Ct)を用いる統計法を用いた。 MacSynergy 解析では、軽度ながら有意な相乗作用が3試験中1試験で認められ、他の2試験では相加的な抗ウイルス作用がみられた[表 2.6.2.B-18]。この直接 Ct 解析により3試験を併合したところ、DAA 間での相互作用はほぼ相加的であった(より詳細は2.6.2.A.2.1.5.2項参照)。 両解析より、、ほとんどの濃度でグラゾプレビル及びエルバスビルの併用による相加作用が認められ、拮抗作用は認められなかった。

表 2.6.2.B-18 エルバスビル及びグラゾプレビル併用による作用: MacSynergy 解析

併用薬物	対数容積、 相乗作用/拮抗作用、 CI 95%	作用
28 8 9 9	4.42/-0.03	軽度ながら有意な相乗作用
グラゾプレビル+ エルバスビル	0.5/-0.45	相加作用
エルハスしル	0.66/-0.24	相加作用

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008]

2.6.2.B.2.1.4.2 エルバスビル及びリバビリンの併用試験: GT1a レプリコン細胞(MK



### 5172A PD008)

GT1a レプリコン細胞を用い、エルバスビル及びリバビリン(抗 HCV 薬)の併用による抗ウイルス活性を評価した[資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008][2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。いずれの濃度の組み合わせにおいても細胞毒性は認められなかった。MacSynergy 解析では、4試験中2試験で強い相乗作用が認められ、他の2試験では相加的な抗ウイルス作用が認められた[表 2.6.2.B-19]。以上より、エルバスビル及びリバビリンの併用による拮抗作用はみられないが、相加的から相乗的な相互作用が認められた。

及 2:0:2:3 10 = 777 :77 2 :	A 2.0.2.B to = // // C/ZO // C // D/M/Co & F/M : Madely Heigh							
併用薬物	対数容積、 相乗作用/拮抗作用、 CI 95%	作用						
	17.57/0.00	強い相乗作用						
	0.0/-0.7	相加作用						
エルバスビル+リバビリン	3.35/0	相加作用						

44.02/-0.02

強い相乗作用

表 2.6.2.B-19 エルバスビル及びリバビリン併用による作用: MacSynergy 解析

### 2.6.2.B.2.1.4.3 エルバスビル及び MK-2248の併用試験

エルバスビル及び MK-2248 (HCV NS5B ヌクレオシド阻害薬、ウリジンヌクレオシドのプロドラッグ) 併用時の活性を検討するため追加の試験を行った[資料4.2.1.1.12: MK-2248A PD001] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。各併用濃度での阻害作用及び予測された相加作用の差を用いて相乗容積及び拮抗容積を算出した[表 2.6.2.B-20]。MacSynergy 解析では、エルバスビル及び MK 2248の併用により3試験中2試験で強力な相乗作用が認められ、最後の3試験目の対数容積推定値が高過ぎたため解析パラメータより無効と判断された。いずれも、これらの併用による拮抗作用は認められなかった。

耒	262B-20 I	レバスビ	ル及が	MK-2248	併用によ	る作用	: MacSynergy 1	娖析
1.	Z.U.Z.D-ZU —	レ ハンハ L ノ	$\nu \propto 0$	'  V   \-\_\_\	D	$\omega$ I $\vdash$ $\Pi$	. IVIACOVIICIAV	コー・コノノ

		5 05
併用薬物	対数容積、 相乗作用/拮抗作用、 CI 95%	作用
	45.98/0	強い相乗作用
エルバスビル+MK-2248	10.88/0	強い相乗作用
	241.36/0	無効なデータ

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.12: MK-2248A PD001]

直接 Ct 解析により3試験を併合したところ、それぞれに見かけの相乗作用を示す領域が認められた。3試験の併合解析より、統計学的に有意な(p<0.01及び<0.001)相乗作用を示す領域の存在が推測された[資料4.2.1.1.12: MK-2248A PD001] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。

<sup>[2.6.3.</sup>B.1項] [資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008]

### 2.6.2.B.2.1.4.4 エルバスビル及びソホスブビルの併用試験

エルバスビル及びソホスブビル (HCV NS5B ポリメラーゼヌクレオシド阻害薬) 併用での GT1a 及び GT3a レプリコン細胞における抗ウイルス活性を検討した[資料4.3: 13]。各薬物の濃度は、それぞれ GT1a 及び GT3a レプリコン細胞での  $EC_{50}$ 値を中心に設定した。 $EC_{50}$ 値を中心に設定した 併用投与の各濃度の組み合わせにおいて、3回の独立した実験により得られた測定値(阻害作用)と相加作用予測値との差について、MacSynergy 解析した[表 2.6.2.B-21]。その結果、エルバスビル及びソホスブビルの併用投与により、GT1a 及び GT3a レプリコン細胞の複製に対して相加作用から相乗作用が認められ、拮抗作用はみられなかった。本試験の Ct 値の直接 Ct 解析(相対 RNA量へは変換せず)より、併用によりレプリコン細胞での HCV RNA 複製阻害作用に、相加から相乗作用が認められた[資料4.2.1.1.14: MK-5172A PD017] [Sec. 2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1]。

GT1a 対数容積、相乗作用/拮抗作用(CI 95%) 作用 併用薬物 強い相乗作用 試験 1 29.44/0 エルバスビル+ソホス 試験 2 0.65/0相加作用 ブビル 中等度の相乗作用 試験 3 7.26/0GT3a 対数容積、相乗作用/拮抗作用(CI 95%) 併用薬物 作用 試験 1 0.091/-1.43相加作用 エルバスビル+ソホス 弱い相乗作用 試験 2 3.38/-0.16 ブビル 0/-2.01相加作用 試験 3

表 2.6.2.B-21 エルバスビル及びソホスブビル併用による作用: MacSynergy 解析

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.14: MK-5172A PD017]

### 2.6.2.B.2.1.4.5 エルバスビル及びグラゾプレビル併用での耐性コロニー選択

GT1a レプリコン細胞を用いて、エルバスビル(NS5A 阻害薬)及びグラゾプレビル(NS3/4A プロテアーゼ阻害薬)併用時の耐性抑制作用を評価した[資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。各薬物を単独又は薬物併用した場合、 $EC_{90}$ 値の倍数が大きくなるに伴い、耐性コロニー数の減少(播種細胞数を100%として算出)が認められた[表 2.6.2.B-22]。グラゾプレビル又はエルバスビルが単独で耐性コロニーの発現を抑制するためには、それぞれ  $EC_{90}$ 値の100倍及び1000倍濃度を必要とした [図 2.6.2.A-3]。併用時には、各化合物はそれぞれ  $EC_{90}$ 値の10倍濃度で耐性コロニーの出現を抑制した[図 2.6.2.A-3B]。耐性コロニー数のこのような濃度依存的な減少は、低濃度での併用によりさらに明確になり[図 2.6.2.A-3B]、耐性発現に至る細部の解析が可能となった。

各  $EC_{90}$ 値の倍数濃度で選択した併用による耐性コロニー数を、[表 2.6.2.B-22]に示す。耐性コロニーからのレプリコンの配列決定より、NS3/4A プロテアーゼ阻害薬又は NS5A 阻害薬に対する耐性と関連した特徴的なアミノ酸変異が認められた。耐性型の解析を[2.6.2.A.2.1.5.2項]に記載

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

した。

表 2.6.2.B-22 エルバスビル及びグラゾプレビルによる耐性コロニー選択: GT1a レプリコン細胞

		エルバスビルの EC <sub>90</sub> の倍数 <sup>a</sup>							
		0倍	1倍	3倍	10倍	30倍			
	0倍	$(100^{b})$	TMTC <sup>c</sup>	293 (0.15)	181 (0.09)	144 (0.072)			
グラゾプレビル <sup>a</sup> の EC <sub>90</sub> の倍数	1倍	TMTC	435 (0.22)	179 (0.09)	82 (0.04)	39 (0.02)			
	3倍	~1000 (~0.5)	255 (0.12)	83 (0.042)	9 (0.0045)	1 (0.0020)			
	10倍	120 (0.06)	38 (0.019)	9 (0.0045)	1 (0.0005)	0			

グラゾプレビルの  $EC_{90}$ 値 = 1.5 nM、エルバスビルの  $EC_{90}$ 値 = 6 pM

- a 各濃度について2×10<sup>5</sup>個の細胞を播種した培養皿を3~4枚使用した。
- b 薬物無処置の場合には細胞叢となり、これを100%とした。
- c 過多のため計測不可 (TMTC):細胞を分割培養したため定量不可

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008]

以上より、GT1a レプリコン細胞におけるエルバスビルとグラゾプレビルの併用により耐性に対する障壁が高くなり、耐性コロニー出現の効果的な抑制が認められた。

細胞レベルでの試験の結果をまとめると、エルバスビルは強力な HCV NS5A 阻害薬であり、幅広い genotype において臨床で高頻度に認められる耐性変異に対して広く活性を示し、NS3/4A 又は NS5B における多くの耐性変異に対する交差耐性は認められなかった[資料4.3:14]。エルバスビル及びグラゾプレビル、リバビリン又はソホスブビルとの併用では、in vitro での拮抗作用は認められず、MK-2248との併用では相乗作用が認められた。また、エルバスビル及びグラゾプレビルの併用により耐性出現は極めて有効に抑制された。

### 2.6.2.B.2.2 In Vivo 試験

臨床では NS5A 阻害薬の proof-of-concept が得られている[資料4.3: 15] [資料4.3: 16]。このため、エルバスビルを用いた in vivo 非臨床試験は実施しなかった。

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.B.3 副次的薬理試験

2.6.2.B.3.1 In vitro 薬理試験

### 2.6.2.B.3.1.1 エルバスビルの非標的分子に対する活性

[資料4.2.1.2.2: MK-8742 PD001] [資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002] [資料4.2.1.2.4: MK-5172A PD012] [資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011]

一連のカウンタースクリーニングを 社にて行った。116の酵素又は放射性リガンド結合試験において、エルバスビルによる明らかな活性は認められなかった[資料 4.2.1.2.2: MK-8742 PD001] [2.6.3.B.1項]。

放射性リガンドを用いたアッセイでは、 $IC_{50}$ 値が $10~\mu M$ 未満となる3種類の分子が同定された。。 データを[表 2.6.2.B-23]に示す。

表 2.6.2.B-23 非標的分子に対する活性:競合的結合の標的 (IC<sub>50</sub><10 µM)

放射リガンドアッセイ	動物種	$IC_{50} (\mu M)$
セロトニン (5-ヒドロキシトリプタミン) 5-HT <sub>2A</sub>	ヒト	3.91
アデノシン輸送体	モルモット	4.17
エンドセリン ETA	ドト	7.8

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.2.2: MK-8742 PD001]

酵素アッセイでは、 $IC_{50}$ 値が $10\,\mu$ M 未満である3種の分子が同定された。1つの分子のみ(ラット蛋白セリン/スレオニンキナーゼ PKC、非選択的)の  $IC_{50}$ 値が $0.877\,\mu$ M( $1\,\mu$ M 未満)であり、HCV GT 1レプリコン (レプリコン  $EC_{90}$ ) に対するその特異性は100,000倍を超えた。ヒト MAPK3蛋白セリン/トレオニンキナーゼに対する  $IC_{50}$ 値は $2.02\,\mu$ M であった。データを[表 2.6.2.B-24]に示す。

表 2.6.2.B-24 非標的分子に対する活性:酵素阻害の標的(IC<sub>50</sub><10 µM)

主な酵素アッセイ	動物種	$IC_{50} (\mu M)$
非選択的セリン/スレオニンキナーゼ PKC	ラット	0.877
非選択的セリン/スレオニンキナーゼ PKA	ウシ	1.65
セリン/スレオニンキナーゼ MAPK3 (ERK1)	ヒト	2.02

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.2.2: MK-8742 PD001]

プロドラッグの代謝に特に重要な CES1、CES2及び Cat A プロテアーゼに対するエルバスビルの阻害作用を、遺伝子組換え酵素アッセイで評価した[資料4.2.1.2.4: MK-5172A PD012] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。データを[表 2.6.2.B-25]に示す。結果より、エルバスビルを介した顕著な酵素阻害は生じないことが示された。したがって、CES1、CES2及び Cat A 阻害に関するエルバスビルの IC50

### 2.6.2 薬理試験の概要文

値は本剤の溶解限界濃度を超えていると判断された。以上より、プロドラッグ及び併用する可能性のある他の治療薬について、CES1/CES2及び Cat A を介した代謝に対してエルバスビルが影響を及ぼす可能性はないと考えられた。

表 2.6.2.B-25 CES1、CES2 及び CatA に対するエルバスビルの阻害活性

阻害活性の IC <sub>50</sub> (μM)				
CES1	CES2	Cat A		
>50	>50	>50		

[2.6.3.B.1項][資料4.2.1.2.4: MK-5172A PD012]

エルバスビルの細胞毒性を、数種の細胞株を用いた3つの独立した相補的な試験(MTS、 $^{14}$ C チミジンの DNA 取り込み、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH mRNA の解析)で検討した。評価したすべての細胞株において、検討した最高濃度(25  $\mu$ M)までの濃度で細胞毒性は認められなかった[資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。したがって、エルバスビルの  $CC_{50}$  値は25  $\mu$ M を上回る。データを[表 2.6.2.B-26]に示す。エルバスビルの GT1、GT4及び GT6阻害に関する  $EC_{90}$ 値は20  $\mu$ M 未満であり、治療指数は1 ×  $10^6$ を上回ると算出された。

表 2.6.2.B-26 細胞株を用いたエルバスビルの細胞毒性の評価

細胞株	MTS アッセイ	<sup>14</sup> C チミジン DNA 合成 アッセイ	GAPDH qPCR アッセイ
		$CC_{50} (\mu M)$	
Huh7	>25	>25	>25
HepG2	>25	>25	>25
HEK293T	>25	>25	>25
Нер3В	>25	>25	>25
MT4	>25	NT <sup>a</sup>	$NT^{a}$

a NT=実施せず

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011]

これらのデータは、エルバスビルが NS5A の特異的阻害薬であり、最大25  $\mu$ M まで細胞毒性を示さないことを示唆している。

### 2.6.2.B.3.1.2 他のウイルスに対するエルバスビルの活性

[資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011] [資料4.2.1.2.5: MK-5172A PD014] [資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015]

### 2.6.2.B.3.1.2.1 HIV 感染アッセイでのエルバスビルの活性

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染におけるエルバスビルの活性を検討するために、MT4-GFP 細胞を用いた多重感染アッセイを行った[資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。 HIV-1複製を MT4-gag-GFP クローン D を用いてモニターした。この細胞は、GFP レポーター遺伝子[HIV-1タンパク質であるトランス-活性化調節タンパク質(tat)とウイルス粒子タンパク質発現の調節因子 (rev) に依存]を発現するよう組み換えた MT 細胞である。MT4-GFP 細胞に対して HIV-1を増殖性感染させた結果、感染後約24時間で GFP の発現が認められた。10%又は50%の NHS 存在下での HIV 感染アッセイで、8.4  $\mu$ M(検討した最高濃度)の濃度で、測定可能なエルバスビルによる阻害活性は認められなかった。 MT4細胞に対する明らかな細胞毒性も認められなかった。これより、エルバスビルは HIV 重複感染患者に対する影響がないことが示された。データを[表 2.6.2.B-27]に示す。

表 2.6.2.B-27 多重感染アッセイにおけるエルバスビルによる HIV 感染阻害

	MT4細胞での	MT4細胞での
	HIV 感染阻害	毒性アッセイ
	$EC_{50} (nM)^a$	$CC_{50} (nM)^a$
陽性対照 b	0.79	≥980
エルバスビル	≥8400	≥8400

a 2回の測定の平均値

### 2.6.2.B.3.1.2.2 各種 HIV 治療薬との併用時のエルバスビルの活性

HCV 患者では、その多くが HIV と重複感染するため、患者はこれらに対する治療を同時に受ける可能性がある[資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。エルバスビルと各 HIV 治療薬との併用による HIV 複製阻害活性の変化の有無を検討した。エルバスビル濃度は30(ヒトでの50 mg 投与時の血漿中  $C_{min}$ )、100(同じく  $C_{max}$ )及び500 nM(同じく  $C_{max}$ の5倍)とした。いずれの濃度のエルバスビル存在下においても HIV 治療薬の  $EC_{50}$ 値の有意な変化は認められなかった。データを[表 2.6.2.B-28]に示す。

b 陽性対照として HIV-1非ヌクレオシド逆転写酵素阻害薬を用いた。

<sup>[2.6.3.</sup>B.1項] [資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011]

表 2.6.2.B-28 培養細胞における各種 HIV 治療薬の HIV 複製阻害活性に対するエルバスビルの影響

		エルバスビ	ル濃度 (nM)			
HIV 治療薬	0	30	100	500		
	$EC_{50} (nM)^a$					
テノホビル	$91 \pm 12$	$89 \pm 27$	$92 \pm 28$	$95 \pm 25$		
エムトリシタビン	$165 \pm 72$	$165 \pm 77$	$156 \pm 68$	$173 \pm 72$		
エファビレンツ	$2.1 \pm 0.59$	$2.4 \pm 0.1$	$2.0 \pm 0.1$	$2.6 \pm 0.2$		
リルピビリン	$2.4 \pm 0.42$	$2.9 \pm 0.3$	$2.6 \pm 0.2$	$2.8 \pm 0.5$		
ダルナビル	$3.9 \pm 0.42$	$4.2 \pm 0.6$	$4.1 \pm 0.7$	$3.7 \pm 0.2$		
アタザナビル	$5.9 \pm 0.96$	$4.9 \pm 0.3$	$5.2 \pm 0.3$	$5.5 \pm 0.8$		
ラルテグラビル	$11 \pm 2.47$	$13 \pm 3.2$	$11 \pm 2.6$	$13 \pm 1.0$		
ドルテグラビル	$12 \pm 2.15$	$12.3 \pm 0.6$	$11.4 \pm 1.9$	$12.2 \pm 2.3$		
エンフビルチド	$9.2 \pm 0.04$	$7.4 \pm 0.4$	$8.4 \pm 0.6$	$8.3 \pm 1.2$		
マラビロク	$0.38 \pm 0.02$	$0.42 \pm 0.09$	0.41±0.04	0.41±0.02		

a 平均値±標準偏差 (N≥3)

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015]

さらに、GT 1a レプリコン細胞を用いて既存の HIV 治療薬によるエルバスビルの阻害活性への影響を評価した[資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。テノホビルジソプロキシル、リルピビリン、ラルテグラビル、アタザナビル及びエンフビルチドについては、ヒト血漿中  $C_{min}$ 、 $C_{max}$  及び  $C_{max}$  の5倍の濃度で、HCV GT1a レプリコン細胞におけるエルバスビルの阻害活性に影響しなかった。エファビレンツ、エムトリシタビン、ダルナビル及びドルテグラビルについては、最大20  $\mu$ M までの濃度でエルバスビルの阻害活性に影響しなかった。データを[表 2.6.2.B-29]に示す。

表 2.6.2.B-29 GT1a レプリコン細胞におけるエルバスビルの活性に対する各種 HIV 治療薬の影響

HIV 治療薬		エルバスし	エルバスビルの活性 ª		
		$EC_{50} \pm SD (pM)$	$EC_{90} \pm SD (pM)$		
一般名	濃度 (μM)	LC30 ± BD (pW)	DC90 = 5D (pW)		
薬物なし(対照)	0	$0.77 \pm 0.28$	$1.59 \pm 0.58$		
	0.3	$0.83 \pm 0.38$	$1.44 \pm 0.69$		
テノホビル	1	$0.67 \pm 0.40$	$1.31 \pm 0.66$		
	3	$0.84 \pm 0.48$	$1.86 \pm 0.97$		
	2.2	$0.80 \pm 0.47$	$1.63 \pm 1.23$		
エムトリシタビン <sup>b</sup>	6.6	$0.78 \pm 0.51$	$1.60 \pm 1.26$		
	20	$0.74 \pm 0.34$	$1.43 \pm 0.95$		
	2.2	$0.68 \pm 0.45$	$1.12 \pm 0.61$		
エファビレンツ b	6.6	$0.78 \pm 0.53$	$1.23 \pm 0.67$		
	20	$0.64 \pm 0.23$	n/a <sup>c</sup>		
	0.3	$0.91 \pm 0.23$	$1.60 \pm 0.61$		
リルピビリン	1	$0.89 \pm 0.46$	$1.54 \pm 0.73$		
	3	$0.90 \pm 0.39$	$1.60 \pm 0.84$		
	2.2	$0.80 \pm 0.45$	$1.43 \pm 0.95$		
ダルナビル <sup>b</sup>	6.6	$0.82 \pm 0.53$	$1.24 \pm 0.65$		
	20	$0.76 \pm 0.57$	$1.36 \pm 0.90$		
	1	$0.75 \pm 0.22$	$1.38 \pm 0.61$		
アタザナビル	3	$0.81 \pm 0.39$	$1.55 \pm 0.48$		
	10	$0.70 \pm 0.27$	$1.26 \pm 0.51$		
	0.3	$0.68 \pm 0.42$	$1.55 \pm 0.87$		
ラルテグラビル	1	$0.85 \pm 0.40$	$1.80 \pm 1.34$		
	3	$0.76 \pm 0.46$	$1.76 \pm 1.40$		
	2.2	$0.64 \pm 0.20$	$1.08 \pm 0.39$		
ドルテグラビル <sup>b</sup>	6.6	$0.70 \pm 0.49$	$1.49 \pm 0.74$		
	20	$0.76 \pm 0.58$	$1.47 \pm 0.77$		
	0.3	$0.75 \pm 0.41$	$1.46 \pm 1.03$		
マラビロク	1	$0.73 \pm 0.29$	$1.42 \pm 0.75$		
	3	$0.86 \pm 0.64$	$1.43 \pm 1.06$		
	0.3	$0.93 \pm 0.78$	$1.38 \pm 0.85$		
エンフビルチド	1	$0.91 \pm 0.65$	$1.44 \pm 1.14$		
	3	$0.74 \pm 0.49$	$1.24 \pm 0.82$		

a SDは3回以上の独立した実験から算出した。

[2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015]

### 2.6.2.B.3.1.2.3 HBV 感染アッセイでのエルバスビルの活性

2コピーの HBV 株の ayw ゲノムを有し、恒常的に HBV を産生している肝芽腫細胞株 HepG2.2.15 を用いて、エルバスビルの活性を検討した[資料4.2.1.2.5: MK-5172A PD014] [2.6.3.B.1; 2.6.3.A.1項]。 この抗 HBV アッセイは、 にて実施され、リアルタイム qPCR(TaqMan) で細胞外 HBV DNA コピー数を直接測定した。その結果、最終濃度10  $\mu$ M 以下のエルバスビルは 本アッセイにおいて活性を示さなかった。また、MTS 取り込みアッセイにおいて細胞毒性は認められなかった。したがって、HBV 重複感染患者に対して、エルバスビルは影響を及ぼさないと推

b 細胞毒性を避けるために、最高濃度の上限は20 μM とした。

c データなし (細胞毒性により活性の正確な測定が行えなかった)。

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

測される。データを[表 2.6.2.B-30]に示す。

表 2.6.2.B-30 HepG2.2.15 細胞を用いた HBV 複製アッセイにおけるエルバスビルの活性

	HepG2.2.15細胞における HBV 感染阻害 IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	HepG2.2.15細胞における 細胞毒性アッセイ CC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>
陽性対照 b	36.9	>500,000
エルバスビル	>10,000	>10,000

- a 2回の測定の平均値
- b 陽性対照は HBV ヌクレオシド阻害薬3TC (ラミブジン) とした。
- [2.6.3.B.1項] [資料4.2.1.2.5: MK-5172A PD014]

### 2.6.2.B.4 安全性薬理試験

エルバスビルの心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対する作用を検討するため、ICH S7A 及び S7B ガイドラインに準拠した in vitro 及び in vivo 安全性薬理試験を実施した[表 2.6.2.B-31]。実施した非臨床安全性薬理試験の一覧を薬理試験の概要表に示す[2.6.3.B.1項]。

### 表 2.6.2.B-31 エルバスビルの安全性薬理試験の概要

エルバスビルの安全性薬理試験				
試験番号 (GLP 適用の有無)	(ICH S7A 及び S7B ガイドライン準拠) 試験名	投与量		
TT # -3196 (非 GLP)	哺乳類細胞に安定発現させた HERG(IK <sub>r</sub> )、 HKCNQ1/hKCNE1(IK <sub>s</sub> )及び hNav1.5(IN <sub>a</sub> )電流に 対する被験物質の作用	該当せず (in vitro 試験)		
TT # -4703 (GLP)	CHO 細胞に安定発現させた hERG チャネル電流に おける電気生理学的評価	該当せず (in vitro 試験)		
TT # -5352 (非 GLP)	心血管系への影響を評価するラットでのテレメト リー試験	10, 40 mg/kg		
TT # -5474 (GLP)	エルバスビル (別名 ) の心血管系への 薬理学的影響を評価する雄性ビーグルを用いたテ レメトリー試験	0.5, 2, 50 mg/kg		
TT # -5606 (GLP)	経口投与による呼吸機能への影響を評価するビー グルでのテレメトリー試験	2, 25, 50 mg/kg		
TT # -6014 (GLP)	小核試験及び機能観察総合評価を含むラットの14 日間経口投与毒性試験	100, 300 mg/kg/日, 1000 mg/kg b.i.d. <sup>a</sup>		
	その他の試験 (バイオマーカー及び遺伝子発現)			
TT # -3511 (非 GLP)	雌ラットを用いた探索的4日間経口投与安全性リー ド最適化試験	10, 40 mg/kg/ 日 <sup>b</sup>		
TT# -3521 (非 GLP)	雄ラットを用いた探索的4日間経口投与安全性リー ド最適化試験	30, 300 mg/kg/日 <sup>b</sup>		
TT # -9749 (非 GLP)	In Vivo 肝臟反応試験	750 mg/kg/ 日 <sup>c</sup>		
TT # -1154 (非 GLP)	イヌを用いた経口投与での探索的薬理試験	2, 20, 200, 750 mg/kg		

- a FOB は初回投与後の第1日目に実施した。
- b 4連続日反復投与
- c 7連続日反復投与

b.i.d.=1日2回投与、GLP=Good Laboratory Practice(医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準)[2.6.3.B.4項]

### 2.6.2.B.4.1 安全性薬理試験

2.6.2.B.4.1.1 哺乳類細胞に安定発現させた HERG( $IK_r$ )、HKCNQ1/hKCNE1( $IK_s$ )及 び hNav1.5( $IN_a$ )電流に対するエルバスビルの作用

[資料4.2.1.3.7: TT# -3196]

哺乳類細胞で発現させた  $IK_r$ 、 $IK_s$ 及び心筋細胞ナトリウムチャネル hNav1.5に対するエルバス ビルの作用を検討した[資料4.2.1.3.7: TT# -3196] [2.6.3.B.4項]。これらの探索的試験において、エルバスビルによる hERG 電流  $IK_r$ 又は  $IK_s$ に対する作用はほとんど又は全く認められなかった。検討した最高濃度(30  $\mu$ M)での平均減少率は、hERG アッセイでは1.6%、 $IK_s$ アッセイでは1.3%であった。30  $\mu$ M での Nav1.5阻害の程度は17.4%であった。

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

# 2.6.2.B.4.1.2 CHO 細胞に安定発現させた hERG チャネル電流における電気生理学的評価

[資料4.2.1.3.12: TT# -4703]

標準的なホールセルパッチクランプ法を用いて、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) - K1 細胞に異種発現させた hERG チャネルに対するエルバスビルの作用を検討した[資料4.2.1.3.12: TT# -4703] [2.6.3.B.4項]。本試験では、試験可能な最高濃度である10 μM (溶解限界濃度) で hERG 電流の5.2%低下が観察されたが、統計学的に有意ではなかった。これらの結果は前述した結果と一致すると考えられる。

### 2.6.2.B.4.1.3 心血管系への影響を評価するラットでのテレメトリー試験

[資料4.2.1.3.10: TT# -5352]

Sprague-Dawley ラット(雌5匹)に対して、溶媒(0.5% [w/v] メチルセルロース/脱イオン水)のみ又はエルバスビル10及び40 mg/kg の単回漸増経口投与(10 mg/kg と40 mg/kg 投与の間には2日間の休薬あり)を行い、ラジオテレメトリーを用いて血行動態(動脈圧パラメータ及び心拍数)への作用を検討した[資料4.2.1.3.10: TT# -5352][2.6.3.B.4項]。溶媒及びエルバスビル投与後の約20時間、テレメトリーでモニターした。同一時点の溶媒対照と比較して、10及び40 mg/kg 投与後の血行動態パラメータ(収縮期、拡張期及び平均血圧並びに心拍数)においてエルバスビルに関連した作用はみられなかった。このテレメトリー試験の結果から、ラットにエルバスビルを単回経口投与したときの血行動態(動脈圧及び心拍数)に関する無作用量は40 mg/kg であった。

#### 2.6.2.B.4.1.4 心血管系への薬理学的影響を評価するビーグルでのテレメトリー試験

[資料4.2.1.3.11: TT# -5474]

エルバスビルの心血管系機能への作用を評価するため、覚醒下のビーグル犬(雄4匹)にエルバスビル0.5、2及び50 mg/kg 又は溶媒(10% [w/w] ポリソルベート80 / 超純水)のみを単回経口投与した[資料4.2.1.3.11: TT# -5474] [2.6.3.B.4項]。投与後約24時間、テレメトリーを用いて、心拍数、動脈圧(収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧及び脈圧)並びに心電図パラメータ(PR、QRS、QT 及び RR 間隔)をモニターした。QT 間隔は Fridericia の補正法を用いて心拍数で補正した( $QT_{cf}$  間隔)。エルバスビルに関連した血行動態及び心電図への影響はみられず、心血管系機能に関する無作用量は50 mg/kg であった。

# 2.6.2.B.4.1.5 経口投与による呼吸機能への影響を評価するビーグルでのテレメトリー 試験

[資料4.2.1.3.13: TT# -5606]

エルバスビルの呼吸系機能への作用を評価するため、覚醒下のビーグル犬(雌雄各2匹)にエルバスビル2、25及び50 mg/kg 又は溶媒(10% [w/w] ポリソルベート80/脱イオン水)のみを単回経口投与した[資料4.2.1.3.13: TT# = -5606][2.6.3.B.4項]。投与後約24時間、テレメトリーを用いて、呼吸数及び呼吸深度並びに体温をモニターした。エルバスビルに関連した呼吸系又は体温への影 2.6.2 薬理試験の概要文



2.6.2 薬理試験の概要文

響はみられず、本試験における呼吸系機能及び体温に関する無作用量は50 mg/kg であった。

### 2.6.2.B.4.1.6 小核試験及び機能観察総合評価を含むラットの14日間経口投与毒性試験

[資料4.2.3.2.13: TT# -6014]

エルバスビルの中枢神経系機能への作用を評価するために、Wistar Han ラットを用いた14日間経口投与毒性試験(溶媒[対照群:5%(w/w)ポリソルベート80/脱イオン水]又はエルバスビル100、300又は1000 mg/kg b.i.d.強制経口投与)の投与第1日の投与後に、機能観察総合評価を実施した[資料4.2.3.2.13: TT# -6014] [2.6.3.B.4項]。機能観察総合評価には各群雄6匹を用い、自律神経系機能、知覚/運動活性(ホームケージ及びオープンフィールド)、刺激反応性、覚醒/警戒性、体位及び歩行異常、前肢及び後肢の握力、着地時の後肢開脚幅、痛覚反応(ホットプレート法での反応潜時)、常同行動、自発運動及び体温について評価した。本評価は投与から約4時間後(推定  $T_{max}$ )に実施した。エルバスビルに関連した影響はみられなかった。本試験における中枢神経系機能に関する無作用量は1000 mg/kg であった。

### 2.6.2.B.4.2 その他の試験

追加のスクリーニング試験として、ラット及びイヌを用いたエルバスビルの血清生化学的プロファイル、並びにラットを用いた主要臓器・組織(肝臓、腎臓、骨格筋、心臓等)での種々の生理学的又は病理学的な機能パスウェイ上の遺伝子発現変化を評価した。

### 2.6.2.B.4.2.1 雌雄ラットを用いた探索的4日間経口投与安全性リード最適化試験

[資料4.2.1.3.8: TT# -3511][資料4.2.1.3.9: TT# -3521]

第一の試験では、雌 Wistar Han ラットを3群(各群雌4匹)に分け、エルバスビル10 mg/kg/日、40 mg/kg/日又は溶媒のみ(0.5% [w/w] メチルセルロース/脱イオン水)を4日間経口投与した[資料4.2.1.3.8: TT# -3511] [2.6.3.B.4項]。死亡の有無、臨床兆候、体重、血清生化学(心筋トロポニン I を含む)、肝臓重量、及び肝臓、腎臓、心臓及び大腿四頭筋での遺伝子発現について調べた。血漿中エルバスビル濃度を測定した。死亡例はなかった。エルバスビルに関連した一般状態、体重、血清生化学及び遺伝子発現(肝臓、腎臓、心臓、大腿四頭筋)の変化は認められなかった。10及び40 mg/kg/日での全身曝露量(AUC<sub>0-24 hr</sub>) はそれぞれ0.071 μM•hr 及び0.666 μM•hr であった。

第二の試験では、雄 Wistar Han ラットを3群(各群雄4匹)に分け、エルバスビル30 mg/kg/日、300 mg/kg/日又は溶媒のみ(10% [w/w] ポリソルベート80/脱イオン水)を4日間経口投与した[資料4.2.1.3.9: TT# -3521] [2.6.3.B.4項]。死亡の有無、一般状態、体重、血清生化学(心筋トロポニン I を含む)、肝臓重量、及び肝臓、腎臓、心臓及び大腿四頭筋での遺伝子発現について調べた。血漿中エルバスビル濃度を測定した。死亡例はなかった。エルバスビルに関連した一般状態、体重、血清生化学の変化は認められなかった。遺伝子発現解析の結果、エルバスビルはラットの肝臓、腎臓、心臓又は大腿四頭筋における生理学的又は病理学的機能にわずかに影響した。30及び300 mg/kg/日での全身曝露量(AUC<sub>0-24 hr</sub>)はそれぞれ2.07 μM•hr 及び11.2 μM•hr であった。



#### 2.6.2.B.4.2.2 In Vivo 肝臓反応試験

[資料4.2.1.3.14: TT# -9749]

探索的スクリーニングとして、Wistar Han ラット(各群雄5匹)に10%(w/w)ポリソルベート 80/脱イオン水又はエルバスビル750 mg/kg/日(1日1回、7日間)を投与し、肝臓での生理学的又 は病理学的機能に関連したパスウェイの変化を評価した[資料4.2.1.3.14: TT# -9749] [2.6.3.B.4項]。 凍結肝臓検体から総 RNA を抽出し、肝臓で発現する672の遺伝子についてエルバスビルに関連した発現の変化を調べた。観察された遺伝子発現変化の程度より、エルバスビルはラットの肝機能にほとんど影響を及ぼさないことが示された。

### 2.6.2.B.4.2.3 イヌを用いた経口投与での探索的薬理試験

[資料4.2.1.3.6: TT# -1154]

本試験はイヌでのエルバスビルの血清生化学的プロファイルを検討することを目的とした。 10% (w/w) ポリソルベート80/脱イオン水に溶解したエルバスビルを各群雌雄各1匹からなる2 群のビーグル犬に経口投与した[資料4.2.1.3.6: TT# -1154] [2.6.3.B.4項]。試験第1日に各群に20又は200 mg/kg を単回投与した後、6日間の休薬期間をおいて、試験第8日に2又は750 mg/kg を単回投与した。死亡の有無、一般状態及び血清生化学的検査を評価した。各投与量での血漿中エルバスビル濃度を測定した。最終試料の採取後、動物をコロニーに戻した。試験期間中の死亡は認められなかった。血清生化学的検査値の変化は認められなかった。一般状態の所見は、粘液便(200及び750 mg/kg 群1匹 [個体番号10-0409])、薄茶色便(750 mg/kg 群2匹 [個体番号10-0409及び10-0410])並びに食物の嘔吐(750 mg/kg 群1匹 [個体番号10-0410])のみであった。

薬物動態パラメータを[表 2.6.2.B-32]に示す。

試験第1日目 20 mg/kg 200 mg/kg雌 雄 雌 雄 10-0407 10-0408 10-0409 10-0410 3.28 8.7  $AUC_{0-24 \text{ hr}}(\mu\text{M} \cdot \text{hr})$ 11.4 16.6  $C_{max}(\mu M)$ 0.906 0.280 0.781 0.627  $T_{\text{max}}(hr)$ 2 4 試験第8日目 750 mg/kg 2 mg/kg雌 雄 雌 雄 10-0407 10-0408 10-0409 10-0410 1.1 1.21 39.5 39.1  $AUC_{0-24 \text{ hr}}(\mu M \cdot hr)$ 0.094 2.06 2.32  $C_{max}(\mu M)$ 0.11

表 2.6.2.B-32 エルバスビルの血漿中薬物動態パラメータ

[2.6.3.B.4項]

 $T_{max}(hr)$ 

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.B.5 薬力学的薬物相互作用

エルバスビルの薬力学的薬物相互作用をみた in vivo 試験は実施していない。

### 2.6.2.3 考察及び結論

### 2.6.2.3.1 In vitro 及び in vivo 試験のまとめ:グラゾプレビル

酵素又は細胞を用いた試験の結果より、グラゾプレビルは強力な HCV NS3/4a プロテアーゼ阻害薬であり、また、広い genotype 及び高頻度に臨床でみられる耐性変異(GT1a Q80K 変異等)に対して活性を有することが示された。ペプチド加水分解による酵素アッセイでの本薬の活性(IC $_{50}$ 値)は、いずれの genotype においても nM を下回るレベルであった。細胞を用いたアッセイでは、グラゾプレビルは臨床分離株に対しては nM レベルの活性、GT1a、GT1b、GT4a 及び GT6a レプリコンに対しては nM を下回るレベルの活性を示した。GT2a、GT2b 及び GT3a レプリコンに対する活性は nM レベルであった。ソホスブビルを含む NS5A 阻害薬で頻繁に生じる一連の RAV 並びに NS5B ヌクレオシド及び非ヌクレオシド阻害薬でみられる重要な耐性変異に対しても、グラゾプレビルの活性は維持されていることが示された。

グラゾプレビルには、インターフェロン $\alpha$ 、リバビリン、NS5B ヌクレオシド・非ヌクレオシド阻害薬又はNS5A 阻害薬(エルバスビル)のいずれの薬物との併用においても、in vitro での拮抗作用が認められなかった。エルバスビルとの併用では、レプリコン細胞の耐性に対して高い遺伝的障壁のあることが示された。

チンパンジーを用いた in vivo 慢性感染モデルにおいて、グラゾプレビルは1 mg/kg、1日2回、7日間経口投与により HCV 複製を抑制した (それぞれ、GT1a:3 log、GT1b:4 log 及び GT1a\_R155K:約2 log の低下)。

グラゾプレビルは、HCV NS3/4a プロテアーゼ及びヒトセリンプロテアーゼに対する作用の比較において、優れた選択性 (>300,000倍) を示した。100を超える標的分子からなるパネルを用いた試験結果より、グラゾプレビルによる非標的活性は>1 μM でもわずかであることが示された。

培養細胞を用いた試験において、グラゾプレビルは臨床濃度で HIV 又は HBV の増殖に対する阻害を示さなかった。培養細胞を用いて実施した、10種類の HIV 治療薬(テノホビル、エムトリシタビン、ダルナビル、アタザナビル、ラルテグラビル、ドルテグラビル、エファビレンツ、リルピビリン、エンフビルチド、マラビロク)との併用試験では、マラビロクを除き、グラゾプレビルの影響は認められなかった。グラゾプレビルの100~nM 存在下で、マラビロクの  $EC_{50}$ 値に $1.2~emath{$ emath{}emath{}emath{}emath{}mm

### 2.6.2.3.2 In vitro 及び in vivo 試験のまとめ:エルバスビル

エルバスビルは、ウイルスの NS5A 蛋白を標的とした複製アッセイにおいて、HCV 複製を強力に阻害した。すなわち、サブゲノムレプリコン細胞株のパネルを用いた試験において、エルバスビルは HCV の全 genotype の臨床分離株に対して極めて強力な複製阻害活性を示し、臨床耐性変異に対しても高い活性が維持して認められた。エルバスビルは GT1a、GT1b、GT2a、GT4、GT5 2.6.2 薬理試験の概要文



及び GT6レプリコンに対して pM レベルの活性を示した。31M 多型を有する GT2b 配列及び GT3a に対するエルバスビルの活性はやや低く、nM レベル未満から nM レベルの範囲であった。エルバスビルは臨床で認められる NS3及び NS5B RAV に対しても活性を有していた。エルバスビルはレプリコンアッセイにおいて耐性の出現を効率よく阻止し、特に GT1、GT4及び GT6での耐性出現には複数のヌクレオチド変異が必要であることが示された。これらの所見より、エルバスビルによる耐性出現には障壁が高いことが示された。

エルバスビル及びリバビリン又はソホスブビルを含む NS5B ポリメラーゼ阻害薬との併用により、in vitro での拮抗作用は認められなかった。グラゾプレビルとの併用では、HCV RNA 減少及び選択圧増加に関する相加作用が認められ、耐性出現が強力に抑制された。エルバスビルの活性は他のクラスの HCV DAA による特徴的な RAV の影響を受けないことから、これらの薬物が無効な患者にとっての治療選択肢となる可能性がある。

エルバスビルは NS5A に特異的であり、その非標的活性は極めて低く、HCV NS5A 野生型 GT1 レプリコン及び非標的分子との特異性指数は1/100,000を下まわった。培養細胞を用いた試験において、エルバスビルは臨床濃度で HIV 又は HBV の増殖を阻止しなかった。HIV 及び HCV の複製アッセイにおいて、エルバスビルは臨床濃度で HIV 治療薬(テノホビル、エムトリシタビン、ダルナビル、アタザナビル、ラルテグラビル、ドルテグラビル、エファビレンツ、リルピビリン、エンフビルチド、マラビロク)に対する拮抗作用を示さなかった。エルバスビルは $25~\mu M$  の濃度で細胞毒性を示さず、GT1阻害活性と治療指数は $01 \times 10^6$ 倍を上回った。

### 2.6.2.3.3 安全性薬理試験のまとめ:グラゾプレビル/エルバスビル

グラゾプレビル及びエルバスビル単剤療法での心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対する作用を検討するため、ICH S7A 及び S7B ガイドラインに準拠した in vitro 及び in vivo 安全性薬理試験を実施した。これらの試験において、グラゾプレビル及びエルバスビルによる懸念すべき作用は認められなかった。

### ▶ 心血管系機能

グラゾプレビル及びエルバスビル単剤の心臓再分極及び心伝導に対する作用を in vitro 電気生理学的試験及びイヌを用いた in vivo 試験により評価した。

機能的パッチクランプ法を用いた電気生理学的試験において、グラゾプレビルは hERG 電流を阻害した(IC $_{50}$ 値:25  $\mu$ M)。この hERG アッセイは蛋白質非存在下で実施されたこと、グラゾプレビルのヒトでの蛋白結合率は98%を上回ることを考慮すると、IK $_{\rm r}$  における IC $_{50}$ 値は HCV 感染患者への100 mg 投与時の未結合  $C_{\rm max}$  値の3,000倍を上回る。グラゾプレビルの QT/QTc 間隔(心室再分極の代理指標)に対する作用を調べるために、迷走神経を切断した麻酔下のイヌを用いた試験及び覚醒下のイヌを用いたテレメトリー試験を行った。麻酔イヌでは、検討した最高用量 2 mg/kg(血漿中濃度74.4  $\mu$ M は日本人 HCV 感染患者への100 mg 投与時  $C_{\rm max}$  値の約121倍に相当)までで QT/QTc に対する作用は認められず、覚醒イヌでは、検討した最高用量である600 mg/kg (イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験[TT  $\mu$  -1151] [2.6.6.A.3.9項]での  $C_{\rm max}$  値である105  $\mu$ M は日本人



HCV 感染患者への100 mg 投与時の  $C_{max}$ 値の約170倍に相当)までで QTc に対する作用は認められなかった。これらの試験において QRS 間隔の変化は認められなかった。覚醒イヌのテレメトリー試験で認められた QT 及び PR 間隔の減少は HR 減少と一致した。また、健康被験者を対象とした QTc 臨床試験において、臨床用量よりも高用量(supratherapeutic dose)のグラゾプレビル(1600 mg)を単回経口投与された被験者でのグラゾプレビルに関連した QTc の変化は認められなかった[2.7.2.2.5.1項]。

機能的パッチクランプ法を用いた電気生理学的試験において、試験可能な最大濃度(溶解可能な最大量)であるエルバスビル $10~\mu M$  により、hERG 電流のわずかな減少(5.2%)が認められた。この hERG アッセイは蛋白質非存在下で実施されたこと、エルバスビルのヒトでの蛋白結合率は99%を上回ることを考慮すると、 $IK_r$  における  $IC_{50}$ 値は HCV 感染患者への50~mg 投与時の未結合  $C_{max}$  値の5,500倍を上回る。エルバスビルの QT/QTc 間隔(心室再分極の代理指標)に対する作用を評価するために、覚醒ビーグル犬(雄4匹)を用いたテレメトリー試験を行い、エルバスビル0.5、2及び50~mg/kg を単回経口投与した。検討したいずれの濃度においても、QT/QTc 間隔の変化は認められなかった。また、PR 及び QRS に対する作用も認められなかった。テレメトリー動物では薬物動態評価用の検体を採取しなかったが、イヌの14~日間経口投与毒性試験(TT~ -6013)[2.6.6.B.3.7項]で用いた用量25~mg/kg での  $C_{max}$  値の $0.59~\mu M$  は日本人 HCV 感染患者への50~mg 投与時の  $C_{max}$  値の約3.3倍に相当する。また、健康被験者を対象とした QTc 臨床試験において、臨床用量よりも高用量(supratherapeutic dose)のエルバスビル(700~mg)を単回経口投与された被験者でのエルバスビルに関連した ECG の変化は認められなかった[2.7.2.2.5.2項]。

麻酔イヌ及び覚醒イヌを用いて、グラゾプレビルの血行動態(動脈血圧パラメータ及び心拍数) への作用を検討した。麻酔イヌではグラゾプレビルに関連した作用は認められなかった。覚醒イ ヌではグラゾプレビル5、20及び600 mg/kg について評価した。グラゾプレビルに関連した心拍数 の増加及びそれに伴う QT 間隔の減少が20及び600 mg/kg で、PR 間隔の軽微な減少が600 mg/kg のみで認められた。これらより、この経口投与心血管系テレメトリー試験における心血管系機能 に関する無作用量は5 mg/kg とされた。しかし、上記の心血管系の変化の程度は軽微であった(イ ヌの1ヵ月間経口投与毒性試験[TT#■-1151] [2.6.6.A.3.9項]で測定された C<sub>max</sub>値である11.5 μM は 日本人 HCV 感染患者への100 mg 投与時のグラゾプレビルの  $C_{max}$ 値の19倍に相当)。イヌの1ヵ月 間経口投与毒性試験(最大600 mg/kg/日)では ECG 検査又は組織形態学的評価において心血管系 の変化は認められなかった (TT # -1151) [2.6.6.A.3.9項]。したがって、心血管系機能に関する無 毒性量は600 mg/kg であった (イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験[TT# -1151][2.6.6.A.3.9項]で測定 された $C_{max}$ 値である $105~\mu M$ は日本人HCV感染患者への100~mg投与時の $C_{max}$ 値の約170倍に相当)。 ラット及び覚醒イヌを用いたテレメトリー試験において、エルバスビルの血行動態(動脈血圧 パラメータ及び心拍数) への作用を検討した。覚醒ラット(40 mg/kg)及び覚醒イヌ(最大50 mg/kg) への単回経口投与後の動脈圧及び心拍数に、エルバスビルに関連した変化は認められなかった。 テレメトリーを装着したイヌでは薬物動態用の検体を採取しなかったが、イヌの14日間経口投与 毒性試験(TT# -6013)[2.6.6.B.3.7項]で用いた用量25 mg/kg での  $C_{max}$  値である0.59  $\mu$ M は、日本 人 HCV 感染患者への50 mg 投与時の C<sub>max</sub> 値の約3.3倍に相当する。

心血管系に対するグラゾプレビルの作用は毒性学的又は臨床的に限定的であり、またエルバス ビルの単独投与試験において心血管系の変化は認められず、グラゾプレビル及びエルバスビルの 併用投与における心血管系の相加的又は相加的な変化は考えにくい。

### ▶ 呼吸系機能及び体温

覚醒イヌを用いたテレメトリー試験により、呼吸系機能及び体温に対するグラゾプレビル及びエルバスビル単独での作用を評価した。グラゾプレビルの最高単回投与用量600 mg/kg(イヌの $1 \text{ 为月間経口投与毒性試験[TT # -1151] [2.6.6.A.3.9項] で測定された <math>C_{max}$  値である $105 \mu M$  は日本人 HCV 感染患者への100 mg 投与時の  $C_{max}$  値の約170倍に相当)まででグラゾプレビルに関連した呼吸系機能への作用は認められなかった。エルバスビル2、25及び50 mg/kg 単回経口投与後の呼吸系機能及び体温への作用は認められなかった。呼吸系機能及び体温に関する無作用量は50 mg/kg であった。テレメトリーを装着したイヌでは薬物動態用の検体を採取しなかったが、イヌの14日間経口投与毒性試験 (TT # -6013) [2.6.6.B.3.7項]で用いた用量25 mg/kg での  $C_{max}$  値である $0.59 \mu M$  は、日本人 HCV 感染患者への50 mg 投与時の  $C_{max}$  値の約3.3倍に相当する。

### ▶ 中枢神経系機能

ラットを用いた機能観察総合評価により、中枢神経系機能に対するグラゾプレビル又はエルバスビルの単独での作用を評価した。ラットでのグラゾプレビルの最高単回投与用量1000 mg/kg 又は200 mg/kg (1日2回)において、中枢神経系機能への作用は認められなかった。200 mg/kg/日1日2回投与後の  $C_{\text{max}}$  の評価は行わなかったが、ラットの探索的単回及び反復経口投与トキシコキネティクス試験(TT # 102 [2.6.6.A.3.4項]で測定された50 mg/kg 単回経口投与後の  $C_{\text{max}}$  値である $27.8 \, \mu$ M はヒトでの  $C_{\text{max}}$  値の約45倍に相当する。ラットでのエルバスビルの最高単回投与用量 $1000 \, \text{mg/kg}$  において中枢神経系機能への作用は認められなかった。 $1000 \, \text{mg/kg}$ /日単回投与後の薬物動態用の検体は採取しなかったが、雄ラットを用いた探索的7日間忍容性試験(TT #  $1000 \, \text{mg/kg}$  -2901)[ $1000 \, \text{mg/kg}$  -2901) [ $1000 \, \text{mg/kg}$  -2901) [10

以上をまとめると、最適化された安全性薬理試験モデルにおいて、心血管系、中枢神経系及び 呼吸系機能に対するグラゾプレビル又はエルバスビルに懸念すべき作用は認められなかった。さ らに、グラゾプレビル及びエルバスビル単独投与時の安全性薬理プロファイルに基づき、心血管 系、呼吸系又は神経機能に対する両薬による相乗的又は相加的変化は考え難いとされた。

以上の薬理プロファイルより、HCV慢性感染治療におけるグラゾプレビル (100 mg) 及びエルバスビル (50 mg) 併用投与での安全な使用が裏付けられた。



# 参考文献一覧

[資料4.3:9]	Harper S, McCauley JA, Rudd MT, Ferrara M, DiFilippo M, Crescenzi B, et al.
	Discovery of MK-5172, a Macrocyclic Hepatitis C Virus NS3/4a Protease
	Inhibitor. ACS Med. Chem. Lett. 2012;3:332-6.
[資料4.3: 10]	Summa V, Ludmerer SW, McCauley JA, Fandozzi C, Burlein C, Claudio G, et
	al. MK-5172, a Selective Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3/4a Protease with
	Broad Activity across Genotypes and Resistant Variants. Antimicrob. Agents
	Chemother. 2012;56(8):4161-7.
[資料4.3:11]	Coburn CA, Meinke PT, Chang W, Fandozzi CM, Graham DJ, Hu B, et al.
	Discovery of MK-8742: An HCV NS5A Inhibitor with Broad Genotype
	Activity. ChemMedChem 2013;8:1930-1940
[資料4.3: 12]	McGivern DR, Masaki T, Williford S, Ingravallo P, Feng Z, Lahser F, et al.
	Kinetic Analyses Reveal Potent and Early Blockade of Hepatitis C Virus
	Assembly by NS5A Inhibitors. Gastroenterology 2014;1-10
[資料4.3:13]	U.S. Prescribing Information: SOVALDI (sofosbuvir) Tablets: 2013.
[資料4.3: 14]	HCV Phenotype Working Group, Drug Development Advisory Group, Mani N.
	Clinically relevant HCV drug resistance mutations figure and tables. Ann
	Forum Collab HIV Res. 2012 Sep 11;14(3):1-8.
[資料4.3: 15]	Nettles RE, Gao M., Bifano M, Chung E, Persson A, Marbury TC, et al.
	Multiple ascending dose study of BMS-790052, a nonstructural protein 5A
	replication complex inhibitor, in patients infected with hepatitis C virus
	genotype 1. Hepatology 2011;54(6):1956-65.
[資料4.3:16]	Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, et al.
	Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent
	clinical effect. Nature 2010;465:96-100.

# CTD第2部

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
  - 2.6.3 薬理試験概要表

MSD 株式会社

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

# 目次

		頁
セクション A:	グラゾプレビル	2
2.6.3.A.1	薬理試験:概要	2
2.6.3.A.2	効力を裏付ける試験	8
2.6.3.A.3	副次的薬理試験	9
2.6.3.A.4	安全性薬理試験	10
2.6.3.A.5	薬力学的薬物相互作用	13
セクション B: 、	ェルバスビル	14
2.6.3.B.1	薬理試験:概要	14
2.6.3.B.2	効力を裏付ける試験	19
2.6.3.B.3	副次的薬理試験	20
2.6.3.B.4	安全性薬理試験	21
2.6.3.B.5	薬力学的薬物相互作用	26

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# セクション A: グラゾプレビル

2.6.3.A.1 薬理試験:概要

Type of Study	<u>Test</u> System	Method of Administration	Testing Facility	<u>Study</u> Number	Location Vol. Section
Primary Pharmacodynamics	<del></del>				
In Vitro Potency	Recombinant Enzymes	In vitro	MRL US	MK-5172 PD006	[資料 4.2.1.1.6: MK- 5172 PD006]
	ProSEAP phenotype assay Replicon cell lines	In vitro	MRL US	MK-5172 PD001	[資料 4.2.1.1.1: MK- 5172 PD001]
	Replicon cell lines	In vitro	MRL US	MK-5172 PD005	[資料 4.2.1.1.5: MK- 5172 PD005]
	Replicon and Other cell lines	In vitro	MRL US	MK-5172 PD003	[資料 4.2.1.1.3: MK- 5172 PD003]
In Vitro Resistance Analysis	Replicon cell lines	In vitro	MRL US	MK-5172 PD002	[資料 4.2.1.1.2: MK- 5172 PD002]
				MK-5172 PD005	[資料 4.2.1.1.5: MK- 5172 PD005]
				MK-5172A PD016	[資料 4.2.1.1.13: MK- 5172A PD016]
	Transient Infectious virus assay	In vitro	MRL US	MK-5172A PD010	[資料 4.2.1.1.8: MK- 5172A PD010]

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

### 2.6.3.A.1 薬理試験:概要(続き)

Method of **Test Testing** Study Location **Type of Study System** Administration **Facility** Number Vol. Section **Primary Pharmacodynamics** (Cont.) In Vitro Combination Studies Replicon and other MK-5172 PD003 「資料 4.2.1.1.3: MK-In vitro MRL US cell lines 5172 PD003] MK-5172A PD008 [資料 4.2.1.1.7: MK-5172A PD008] Replicon cell lines In vitro MK-2248A PD001 「資料 4.2.1.1.12: MK-MRL US 2248A PD001] MK-5172A PD017 [資料 4.2.1.1.14: MK-5172A PD017] In Vivo Studies Chimpanzee Oral MK-5172 PD004 「資料 4.2.1.1.4: MK-MRL US

5172 PD004]

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.A.1 薬理試験:概要(続き)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing <u>Facility</u>	<u>Study</u> <u>Number</u>	Location <u>Vol. Section</u>
Secondary Pharmacodynamics					
In Vitro Selectivity, In vitro Off-Target Activities, Viruses,	Recombinant enzymes	In vitro	MRL US	MK-5172 PD006	[資料 4.2.1.1.6: MK- 5172 PD006]
Enzymes	Ž			MK-5172A PD012	[資料 4.2.1.2.4: MK- 5172A PD012]
	Recombinant enzymes cell lines	In vitro		MK-5172 PD007	[資料 4.2.1.2.1: MK- 5172 PD007]
	Viruses, other cell lines	In vitro	MRL US	MK-5172A PD011	[資料 4.2.1.2.3: MK- 5172 PD011]
	inies			MK-5172A PD014	[資料 4.2.1.2.5: MK- 5172A PD014]
In Vitro Combination Studies	Replicon cells, viruses, other cell lines	In vitro	MRL US	MK-5172A PD015	[資料 4.2.1.2.6: MK- 5172A PD015]

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.A.1 薬理試験:概要(続き)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing <u>Facility</u>	Study Number	Location <u>Vol.</u> <u>Section</u>
Safety Pharmacology					
Cardiac Ion Channel Assay	hERG potassium channel current (IKr), the slowly activating, delayed rectifier potassium current (IKs) and the cardiac sodium channel current (INa) expressed in mammalian cells	In vitro	MRL WP	TT #3064	[資料 4.2.1.3.1: TT# - 3064]
hERG Assaya	hERG channels heterologously expressed in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells	In vitro	MRL WP	TT # -4721	[資料 4.2.1.3.2: TT# - 4721]

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.A.1 薬理試験:概要(続き)

Test Article: Grazoprevir

Type of Study	Test Method of System Administration		Testing <u>Facility</u>	<u>Study</u> <u>Number</u>	Location <u>Vol.</u> <u>Section</u>	
Safety Pharmacology (Continued)						
Cardiovascular Function	dunction Dog/ Beagle (anesthetized, vagotomized, ventilated)		MRL TJ	TT # -5918	[資料 4.2.1.3.4: TT# - 5918]	
Cardiovascular & Respiratory Function <sup>a</sup>	Dog/ Beagle	Oral by capsule	MRL WP	TT # -5651	[資料 4.2.1.3.3: TT# - 5651]	
Functional Observational Battery <sup>a</sup>	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	MRL WP MRL F	TT # -1152	[資料 4.2.3.2.4: TT# - 1152]	
Functional Observational Battery <sup>a</sup>	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	MRL WP MRL F	TT # -1120	[資料 4.2.3.2.6: TT# - 1120]	
In Vivo Liver Response Assay	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	MRL WP	TT# -9637	[資料 4.2.1.3.5: TT# - 9637]	

Footnotes on following page.

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

### 2.6.3.A.1 薬理試験:概要(続き)

Test Article: Grazoprevir

Type of Study	Test <u>System</u>	Method of Administration	Testing <u>Facility</u>	Study <u>Number</u>	Location Vol. Section
Pharmacodynamic Drug Interactions					
In Vivo Studies	Chimpanzee	Oral	MRL US	MK-5172 PD004	[資料 4.2.1.1.4: MK- 5172 PD004]

Report contains a GLP compliance statement.

Taiwan.

MRL F = Merck Research Laboratories, Mirabel, France.

MRL TJ = Merck Research Laboratories, Tsukuba, Japan.

MRL US = Merck Research Laboratories, U.S.A.

MRL WP = Merck Research Laboratories, West Point, Pennsylvania, U.S.A.

U.S.A.



- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.A.2 効力を裏付ける試験

See Primary Pharmacodynamics [Sec. 2.6.2.A.2].

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.A.3 副次的薬理試験

See Secondary Pharmacodynamics [Sec. 2.6.2.A.3].

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.A.4 安全性薬理試験

Organ Systems <u>Evaluated</u>	Species/ Strain	Method of Adminis- tration	Dose/ Concentration Level <sup>a</sup>	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study <u>Number</u>
Cardiac Ion Channel Panel	hERG potassium channel current (IKr), the slowly activating, delayed rectifier potassium current (IKs) and the cardiac sodium channel current (INa) expressed in mammalian cells	In vitro	0, 3, 10, 30 μM	N/A	Inhibited hERG current with an $IC_{50} = 8.9 \mu M \& IC_{20} = 3.5 \mu M.$ No detectable effect on IKs or INa up to the highest tested concentration of 30 $\mu M$ .	No	TT # -3064 [資料 4.2.1.3.1: TT# -3064]

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.A.4 安全性薬理試験(続き)

	A 4 • T	<b>~</b> .
Test	Article:	Grazoprevir
1000	I AI CICIC.	CIGEOPICII

Organ Systems <u>Evaluated</u>	Species/ Strain	Method of Adminis- tration	Dose/ Concentration Level <sup>a</sup>	Gender and No. <u>per</u> <u>Group</u>	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study <u>Number</u>
hERG Assay	hERG channels heterologously expressed in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells	In vitro	0, 3, 10, 30, 100 μM <sup>b</sup>	N/A	Inhibited hERG current with an $IC_{50} = 25 \mu M \& IC_{20} = 6.3 \mu M.$	Yes	TT# -4721 [資料 4.2.1.3.2: TT# -4721]
Cardiovascular Function	Dog/ Beagle	Intravenous	1, 2, 2 mg/kg <sup>c</sup>	3F	No test article-related effects $C_{max} = 74.4 \mu M$	No	TT # -5918 [資料 4.2.1.3.4: TT# -5918]
Cardiovascular & Respiratory Function	Dog/ Beagle	Oral by capsule	0, 5, 20, 600 mg/kg	2F, 2M	At 600 mg/kg:  ↑ HR (+30%)  ↓ PR interval (-9%)  ↓ QT interval (-9%)  ↔QTc interval	Yes	TT # -5651 [資料 4.2.1.3.3: TT# -5651]
Footnotes on following					At 20 mg/kg:  ↑ HR (+42%)  ↓ QT interval (-7%)  ⇔QTc interval  NOEL = 5 mg/kg		

Footnotes on following page.

2.6.3 薬理試験の概要表

- 11 -



- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

### 2.6.3.A.4 安全性薬理試験(続き)

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Adminis- tration	Dose/ Concentration Levela	Gender and No. <u>per</u> <u>Group</u>	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study <u>Number</u>
Neurobehavioral Function	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 25, 50, 1000 mg/kgd	6M	No test article-related effects.  NOEL: ≥1000 mg/kg	Yes	TT # -1152 [資料 4.2.3.2.4: TT# -1152]
Neurobehavioral Function	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 50, 200 mg/kgd, 200 mg/kge (b.i.d. ~6 hours apart)	6M	No test article-related effects.  NOEL: ≥200 mg/kg (b.i.d.)	Yes	TT # -1120 [資料 4.2.3.2.6: TT# -1120]
In Vivo Liver Response Assay <sup>f</sup>	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 200 mg/kg/day	5F	The extent of the changes in gene expression that were observed indicated that grazoprevir had limited impact on rat liver function.	No	TT # -9637 [資料 4.2.1.3.5: TT# -9637]

a Single dose unless specified otherwise.

b Nominal concentrations of 3.3, 10, 30, and 100 μM were tested.

c All doses of grazoprevir were administered in a cumulative dose intravenous infusion paradigm (successive 30-minute infusion periods; total dose = 5 mg/kg).

d FOB assessments conducted on Study Day 1 (~2 hours after a single oral dose).

e FOB assessments conducted on Study Day 1 (~2 hours following the second b.i.d. dose).

f Frozen liver samples were obtained from rats after repeat dose administration for 7 consecutive days on TT # -2525 [Ref. 4.2.3.2: 03QYJ4] [Sec. 2.6.6.A.3.3] to assess the potential alterations in pathways associated with various physiologic and pathologic functions in rat livers.

b.i.d. = bis in die; F = Female; HR = Heart Rate; M = Male; N/A = Not Applicable; NOEL = no-observed-effect level.

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

## 2.6.3.A.5 薬力学的薬物相互作用

See Pharmacodynamic Drug Interactions [Sec. 2.6.2.A.5].

### グラゾプレビル/エルバスビル 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# セクション B: エルバスビル

2.6.3.B.1 薬理試験:概要

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing <u>Facility</u>	<u>Study</u> <u>Number</u>	Location Vol. Section
Primary Pharmacodynamics					
In Vitro Potency	Replicon cell lines	In vitro	MRL US	MK-8742 PD002	[資料 4.2.1.1.9: MK- 8742 PD002]
				MK-8742 PD003	[資料 4.2.1.1.10: MK- 8742 PD003]
				MK-8742 PD009	[資料 4.2.1.1.11: MK- 8742 PD009]
In Vitro Resistance Analysis	Replicon cell lines	In vitro	MRL US	MK-8742 PD002	[資料 4.2.1.1.9: MK- 8742 PD002]
				MK-8742 PD003	[資料 4.2.1.1.10: MK- 8742 PD003]
				MK-8742 PD009	[資料 4.2.1.1.11: MK- 8742 PD009]
				MK-5172A PD016	[資料 4.2.1.1.13: MK- 5172A PD016]
	Transient Infectious virus assay	In vitro	MRL US	MK-5172A PD010	[資料 4.2.1.1.8: MK- 5172A PD010]

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.B.1 薬理試験:概要(続き)

Test Article: Elbasvir

Type of Study	Test System	Method of <u>Administration</u>	Testing <u>Facility</u>	<u>Study</u> <u>Number</u>	Location <b>Vol.</b> Section
Primary Pharmacodynamics (Continued)					
In Vitro Combination Studies	Replicon cell lines	In vitro	MRL US	MK-5172A PD008	[資料 4.2.1.1.7: MK- 5172A PD008]
				MK-2248A PD001	[資料 4.2.1.1.12: MK- 2248A PD001]
				MK-5172A PD017	[資料 4.2.1.1.14: MK- 5172A PD017]
Secondary Pharmacodynamics					
Off-Target Activity of Elbasvir (Receptors, Ion Channels,	Recombinant enzymes and	In vitro		MK-8742 PD001	[資料 4.2.1.2.2: MK- 8742 PD001]
Enzymes, Viruses)	purified proteins		MRL US	MK-5172A PD012	[資料 4.2.1.2.4: MK- 5172A PD012]
	Replicon cell lines	In vitro	MRL US	MK-8742 PD002	[資料 4.2.1.1.9: MK- 8742 PD002]
	Viral assays cell lines	In vitro	MRL US	MK-5172A PD011	[資料 4.2.1.2.3: MK-
	cen mies			MK-5172A PD014	5172A PD011] [資料 4.2.1.2.5: MK-
In Vitro Combination Studies	Replicon cells, viruses, other cell lines	In vitro	MRL US	MK-5172A PD015	5172A PD014] [資料 4.2.1.2.6: MK- 5172A PD015]

2.6.3 薬理試験の概要表



### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.B.1 薬理試験:概要(続き)

			1 000 TIL VICION ELOWS (II			
Type of Study	<u>Test</u> <u>System</u>	Method of Administration	Testing <u>Facility</u>	<u>Study</u> <u>Number</u>	Location <u>Vol.</u> <u>Section</u>	
Safety Pharmacology						
Cardiac Ion Channel Assays	hERG potassium channel current (IKr), the slowly activating, delayed rectifier potassium current (IKs) and the cardiac sodium channel current (INa) expressed in mammalian cells	In vitro		TT # -3196	[資料 4.2.1.3.7: TT# - 3196]	
hERG Assaya	hERG channels heterologously expressed in Chinese hamster	In vitro	MRL WP	TT # -4703	[資料 4.2.1.3.12: TT# - 4703]	

ovary (CHO-K1)

cells

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.B.1 薬理試験:概要(続き)

Test Article: Elbasvir

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing <u>Facility</u>	<u>Study</u> <u>Number</u>	Location Vol. Section
Safety Pharmacology (Continued)					
Cardiovascular Function	Rat/ Sprague-Dawley	Oral gavage	MRL WP	TT # -5352	[資料 4.2.1.3.10: TT# - 5352]
Cardiovascular Functiona	Dog/ Beagle	Oral gavage		TT # -5474	[資料 4.2.1.3.11: TT# - 5474]
Respiratory Functiona	Dog/ Beagle	Oral gavage	MRL WP	TT # -5606	[資料 4.2.1.3.13: TT# - 5606]
Functional Observational Battery Assaya	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	MRL F MRL WP	TT # -6014	[資料 4.2.3.2.13: TT# - 6014]
Exploratory 4-Day Oral Safety Lead Optimization Study in Female Rats	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage		TT # -3511	[資料 4.2.1.3.8: TT# - 3511]

Footnotes on following page.

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

### 2.6.3.B.1 薬理試験:概要(続き)

<b>T</b>			T 11 '	
Lest	Ar	ticle:	Elbasvir	

Type of Study	Test <u>System</u>	Method of <u>Administration</u>	Testing <u>Facility</u>	Study <u>Number</u>	Location <u>Vol.</u> <u>Section</u>
Safety Pharmacology (Continued)					
Exploratory 4-Day Oral Safety Lead Optimization Study in Male Rats	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage		TT # -3521	[資料 4.2.1.3.9: TT# - 3521]
In Vivo Liver Response Assay	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	MRL WP	TT # -9749	[資料 4.2.1.3.14: TT# - 9749]
Pharmacology	Dog/ Beagle	Oral gavage	MRL WP	TT # -1154	[資料 4.2.1.3.6: TT# - 1154]

a Report contains a GLP compliance statement.

Canada.

U.S.A.

MRL F = Merck Research Laboratories, Mirabel, France.

MRL US = Merck Research Laboratories, U.S.A.

MRL WP = Merck Research Laboratories, West Point, Pennsylvania, U.S.A.

Taiwan.

U.S.A.

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

## 2.6.3.B.2 効力を裏付ける試験

See Primary Pharmacodynamics [Sec. 2.6.2.B.2].

- 19 -

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

## 2.6.3.B.3 副次的薬理試験

See Secondary Pharmacodynamics [Sec. 2.6.2.B.3].

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.B.4 安全性薬理試験

Organ Systems <u>Evaluated</u>	Species/ <u>Strain</u>	Method of <u>Adminis-</u> <u>tration</u>	Dose/ Concentration Level <sup>a</sup>	Gender and No. <u>per</u> <u>Group</u>	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study <u>Number</u>
Cardiac Ion Channel Assays	hERG potassium channel current (IKr), the slowly activating, delayed rectifier potassium current (IKs) and the cardiac sodium channel current (INa) expressed in mammalian cells	In vitro	0, 3, 10, 30 μM (IKr & INa) 0, 30 μM (IKs)	N/A	No effect on IKr or IKs at 30 μM, 17% inhibition of INa at 30 μM (highest concentration tested)	No	TT # -3196 [資料 4.2.1.3.7: TT# -3196]
hERG Assay	hERG channels heterologously expressed in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells	In vitro	0, 10 μM <sup>b</sup>	N/A	A minimal decline in hERG current by 5.2% decrease at highest tested nominal concentration of 10 $\mu$ M.	Yes	TT# -4703 [資料 4.2.1.3.12: TT# -4703]

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

# 2.6.3.B.4 安全性薬理試験(続き)

Organ Systems <u>Evaluated</u>	Species/ Strain	Method of <u>Administration</u>	Dose/ Concentration Level <sup>a</sup>	Gender and No. <u>per</u> <u>Group</u>	Noteworthy Findings	GLP <u>Compliance</u>	Study <u>Number</u>
Cardiovascular Function	Rat/ Sprague- Dawley	Oral gavage	0, 10, 40 mg/kg	5F	No test article-related effects.  NOEL ≥40 mg/kg.	No	TT# -5352 [資料 4.2.1.3.10: TT# -5352]
Cardiovascular Function	Dog/ Beagle	Oral gavage	0, 0.5, 2, 50 mg/kg	4M	No test article-related effects.  NOEL ≥50 mg/kg.	Yes	TT# -5474 [資料 4.2.1.3.11: TT# -5474]
Respiratory Function	Dog/ Beagle	Oral gavage	0, 2, 25, 50 mg/kg	2F, 2M	No test article-related effects.  NOEL ≥50 mg/kg.	Yes	TT# -5606 [資料 4.2.1.3.13: TT# -5606]
Neurobehavioral Function	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 100, 300 mg/kg/dayc, 1000 mg/kgd (b.i.d. ~6 hours apart)	6M	No test article-related effects. NOEL ≥1000 mg/kg.	Yes	TT# -6014 [資料 4.2.3.2.13: TT# -6014]

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

## 2.6.3.B.4 安全性薬理試験(続き)

Test Article: Elbasvir

Organ Systems <u>Evaluated</u>	Species/ Strain	Method of <u>Adminis-</u> <u>tration</u>	Dose/ Concentration Level <sup>a</sup>	Gender and No. <u>per</u> <u>Group</u>	Noteworthy Findings	GLP <u>Compliance</u>	Study <u>Number</u>
Exploratory 4-Day Oral Safety Lead Optimization Study in Female Rats	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 10, 40 mg/kg/day <sup>e</sup>	4F	None <u>Elbasvir</u> At 10 mg/kg/day and 40 mg/kg/day  AUC0-24 hr (μM•hr): 0.071 and 0.666, respectively.	No	TT# -3511 [資料 4.2.1.3.8: TT# -3511]
Exploratory 4-Day Oral Safety Lead Optimization Study in Male Rats	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 30, 300 mg/kg/daye	4M	None <u>Elbasvir</u> At 30 mg/kg/day and 300 mg/kg/day  AUC0-24 hr (μM•hr): 2.7 and 11.2, respectively.	No	TT # -3521 [資料 4.2.1.3.9: TT# -3521]

Footnotes on following page.

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

## 2.6.3.B.4 安全性薬理試験(続き)

Test Article: Elbasvir

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of <u>Adminis-</u> <u>tration</u>	Dose/ Concentration Levela	Gender and No. <u>per</u> <u>Group</u>	Noteworthy Findings	GLP <u>Compliance</u>	Study <u>Number</u>
In Vivo Liver Response Assay	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 750 mg/kg/dayf	4M	The extent of the changes in gene expression that were observed indicated that elbasvir had limited impact on rat liver function.	No	TT# -9749 [資料 4.2.1.3.14: TT# -9749]
Pharmacology	Dog/ Beagle	Oral gavage	20, 200 mg/kg on SD1 2, 750 mg/kg on SD8	1F, 1M	Test article-related findings were limited to changes in fecal appearance at 200 mg/kg and 750 mg/kg and food emesis at 750 mg/kg.  Elbasvir (F/M)  At 2, 20, 200, and 750 mg/kg  AUC <sub>0</sub> -24 hr (μM•hr): 1.1/1.21, 11.4/3.28, 16.6/8.7, and 39.5/39.1, respectively;  Cmax (μM): 0.094/0.11, 0.906/0.280, 0.781/0.627, and 2.06/2.32, respectively;  Tmax (hr): 2/4, 4/2, 2/4, 7/4-7, respectively.	No	TT# -1154 [資料 4.2.1.3.6: TT# -1154]

Footnotes on following page.

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

#### 2.6.3.B.4 安全性薬理試験(続き)

- a Single dose unless specified otherwise.
- b Nominal concentration of 10 µM was tested (limited by solubility).
- c FOB assessments conducted on Study Day 1 (after a single oral dose).
- d FOB assessments conducted on Study Day 1 (after first b.i.d. dose).
- e Repeat dose administration for 4 consecutive days.
- Frozen liver samples were obtained from rats following repeat dose administration for 7 consecutive days on TT# 2-2901 [Ref. 4.2.3.2: 03RJZ5] [Sec. 2.6.6.B.3.2] to assess the potential alterations in pathways associated with various physiologic and pathologic functions in rat livers.
- b.i.d. = Bis in die; F = Female; M = Male; N/A = Not Applicable; NOEL = No-observed-effect level; SD = Study Day; CYP = Cytochrome protein.

- 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
- 2.6.3 薬理試験の概要表

## 2.6.3.B.5 薬力学的薬物相互作用

See Pharmacodynamic Drug Interactions [Sec. 2.6.2.B.5].