CTD 第 2 部

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6　毒性試験の概要文

MSD 株式会社

目次

頁

表一覧 4
略号及び用語の定義 9
2.6.6　毒性試験の概要文 11
2.6.6.1　まとめ 11
2.6.6.A　A 項：グラゾプレビル 32
2.6.6.A.2　単回投与毒性試験 32
2.6.6.A.2.1　雄性 CD1マウスの単回経口投与トキシコキネティクス探索試験（TT#[redacted]-6043） 32
2.6.6.A.3　反復投与毒性試験 33
2.6.6.A.3.1　rasH2野生型マウス（交雑系）の1ヵ月間経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-6034） 34
2.6.6.A.3.2　CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-6038） 36
2.6.6.A.3.3　雌性ラットの7日間経口投与忍容性試験（TT#[redacted]-2525） 38
2.6.6.A.3.4　ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験［機能観察総合評価（FOB）を含む］（TT#[redacted]-1152） 39
2.6.6.A.3.5　ラットの単回及び反復経口投与トキシコキネティクス試験（TT#[redacted]-1102） 41
2.6.6.A.3.6　ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験［機能観察総合評価（FOB）及び投与2週後の中間剖検を含む）（TT#[redacted]-1120） 44
2.6.6.A.3.7　ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6014） 46
2.6.6.A.3.8　イヌの9日間漸増経口投与忍容性試験（TT#[redacted]-1119） 50
2.6.6.A.3.9　イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-1151） 51
2.6.6.A.3.10　イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験（投与3ヵ月後の中間剖検を含む）（TT#[redacted]-6015） 52
2.6.6.A.4　遺伝毒性試験 57
2.6.6.A.4.1　In vitro 試験 57
2.6.6.A.4.2　In vivo 試験 58
2.6.6.A.5　がん原性試験 59
2.6.6.A.6　生殖発生毒性試験 60
2.6.6.A.6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 60
2.6.6.A.6.2　胚・胎児発生に関する試験 61
2.6.6.A.6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 70
2.6.6.A.6.4　幼若動物を用いた試験 71
2.6.6.A.7　局所刺激性試験 71

Confidential

2.6.6.A.7.1　ウシ角膜を用いる混濁度及び透過性試験（BCOP）（TT#[redacted]-7866）.....71
2.6.6.A.7.2　ウサギの急性皮膚刺激性／腐食性試験（TT#[redacted]-7865）.....72
2.6.6.A.8　その他の毒性試験.....72
2.6.6.A.8.1　抗原性試験.....72
2.6.6.A.8.2　免疫毒性試験.....72
2.6.6.A.8.3　毒性発現の機序に関する試験.....73
2.6.6.A.8.4　依存性試験.....80
2.6.6.A.8.5　代謝物に関する試験.....81
2.6.6.A.8.6　不純物に関する試験.....81
2.6.6.A.8.7　その他の毒性試験.....83
2.6.6.B　B 項：エルバスビル.....90
2.6.6.B.2　単回投与毒性試験.....90
2.6.6.B.3　反復投与毒性試験.....90
2.6.6.B.3.1　rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験及びトキシコキネティクス試験（TT#[redacted]-6047）.....91
2.6.6.B.3.2　雄性ラットの7日間経口投与忍容性試験（TT#[redacted]-2901）.....92
2.6.6.B.3.3　ラットの14日間経口投与毒性試験（小核試験及び機能観察総合評価を含む）（TT#[redacted]-6014）.....93
2.6.6.B.3.4　ラットの15日間経口投与トキシコキネティクス試験（TT#[redacted]-6017）.....95
2.6.6.B.3.5　ラットの3ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6024）.....96
2.6.6.B.3.6　ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6033）.....97
2.6.6.B.3.7　イヌの14日間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6013）.....98
2.6.6.B.3.8　イヌの3ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6025）.....100
2.6.6.B.3.9　イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6030）.....103
2.6.6.B.4　遺伝毒性試験.....106
2.6.6.B.4.1　In Vitro 試験.....106
2.6.6.B.4.2　In Vivo 試験.....107
2.6.6.B.5　がん原性試験.....108
2.6.6.B.6　生殖発生毒性試験.....108
2.6.6.B.6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験.....109
2.6.6.B.6.2　胚・胎児発生に関する試験.....110
2.6.6.B.6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験.....113
2.6.6.B.6.4　幼若動物を用いた試験.....114
2.6.6.B.7　局所刺激性試験.....114
2.6.6.B.7.1　ウシ角膜を用いる混濁度及び透過性試験（BCOP）（TT#[redacted]-7807）.....114
2.6.6.B.7.2　MatTek EpiDerm™ MTT Vialibility 試験（TT#[redacted]-7806）.....114
2.6.6.B.8　その他の毒性試験.....115

Confidential

2.6.6.B.8.1　抗原性試験 115
2.6.6.B.8.2　免疫毒性試験 115
2.6.6.B.8.3　毒性発現の機序に関する試験 115
2.6.6.B.8.4　依存性 116
2.6.6.B.8.5　代謝物に関する試験 116
2.6.6.B.8.6　不純物に関する試験 116
2.6.6.B.8.7　その他の試験 118
2.6.6.9　考察及び結論 122
参考文献一覧 133

Confidential

表一覧

頁

表 2.6.6-1　実施したグラゾプレビル及びエルバスビル毒性試験一覧 12
表 2.6.6-2　グラゾプレビルの全身曝露量に基づいた安全域 17
表 2.6.6-3　エルバスビルの全身曝露量に基づいた安全域 27
表 2.6.6.A-1　雄性マウスにグラゾプレビルを単回経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTK パラメータ（平均±標準誤差）（投与1日） 32
表 2.6.6.A-2　グラゾプレビルのマウス、ラット及びイヌにおける反復経口投与毒性試験 33
表 2.6.6.A-3　マウスにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTK パラメータ（平均±標準誤差）（投与4週） 35
表 2.6.6.A-4　マウスにグラゾプレビルを経口投与後の肝臓－胆嚢中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）（投与4週） 35
表 2.6.6.A-5　マウスにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTK パラメータ（平均±標準誤差）（投与13週） 37
表 2.6.6.A-6　マウスにグラゾプレビルを経口投与後の肝臓－胆嚢中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）（投与13週） 37
表 2.6.6.A-7　雌性ラットにおける血漿中及び肝臓中グラゾプレビルのTK パラメータ（平均±標準偏差） 39
表 2.6.6.A-8　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTK パラメータ（平均±標準誤差）（投与5週） 40
表 2.6.6.A-9　ラットにおける試験デザイン 41
表 2.6.6.A-10　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTK パラメータ（平均±標準誤差）（投与1日） 42
表 2.6.6.A-11　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTK パラメータ（平均±標準誤差）（投与14日） 42
表 2.6.6.A-12　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTK パラメータ（平均±標準誤差）（投与1日） 42
表 2.6.6.A-13　ラットにグラゾプレビルの50 mg/kg/日[b]を経口投与後の肝臓中グラゾプレビル 濃度（μM）[a]（個体別値）（投与2日） 43
表 2.6.6.A-14　ラットにグラゾプレビルの50 mg/kg/日[b]を経口投与後の肝臓中グラゾプレビル 濃度（μM）[a]（個体別値）（投与15日） 43
表 2.6.6.A-15　ラットにグラゾプレビルの1000 mg/kg/日[b]を経口投与後の肝臓中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（個体別値）（投与2日） 43
表 2.6.6.A-16　ラットにグラゾプレビルの1000/300 mg/kg/日[b]を経口投与後の 肝臓中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（個体別値）（投与15日） 43
表 2.6.6.A-17　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTK パラメ

Confidential

ータ（平均±標準誤差）（投与2週）.....45
表 2.6.6.A-18　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ（平均±標準誤差）（投与4週）.....45
表 2.6.6.A-19　ラットにおける肝臓中グラゾプレビル濃度（平均）（投与3週、中間剖検）.....45
表 2.6.6.A-20　ラットにおける肝臓中グラゾプレビル濃度（平均）（投与5週、最終剖検）.....46
表 2.6.6.A-21　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ（平均±標準誤差）（投与4週）.....48
表 2.6.6.A-22　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ　（平均±標準誤差）（投与9週）.....48
表 2.6.6.A-23　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ（平均±標準誤差）（投与13週）.....49
表 2.6.6.A-24　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の肝臓中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）（投与27週：最終剖検）.....49
表 2.6.6.A-25　イヌの血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ.....50
表 2.6.6.A-26　イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ　（平均±標準誤差）（投与1日[a]）.....51
表 2.6.6.A-27　イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ　（平均±標準誤差）（投与5週[a]）.....52
表 2.6.6.A-28　イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ　（平均±標準誤差）（投与1日）.....54
表 2.6.6.A-29　イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ　（平均±標準誤差）（投与3週）.....54
表 2.6.6.A-30　イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ　（平均±標準誤差）（投与4週）.....55
表 2.6.6.A-31　イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ　（平均±標準誤差）（投与12週）.....55
表 2.6.6.A-32　イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ　（平均±標準誤差）（投与16週）.....55
表 2.6.6.A-33　イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ　（平均±標準誤差）（投与26週）.....56
表 2.6.6.A-34　グラゾプレビルの生殖発生毒性試験（重要な試験）.....60
表 2.6.6.A-35　妊娠ラットの血漿中グラゾプレビルのTKパラメータ（平均±標準誤差）（妊娠15日）.....62
表 2.6.6.A-36　非妊娠ウサギの経口投与トキシコキネティクス試験の概要.....64
表 2.6.6.A-37　妊娠ウサギにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TKパラメータ（平均±標準誤差）（妊娠15日）.....66
表 2.6.6.A-38　非妊娠ウサギにグラゾプレビルを静脈内投与後の血漿中グラゾプレビルの

Confidential

TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与5日）.....67
表 2.6.6.A-39　妊娠ウサギにグラゾプレビルを静脈内投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（妊娠15日）.....68
表 2.6.6.A-40　妊娠ウサギにグラゾプレビルを静脈内投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（妊娠15日）.....69
表 2.6.6.A-41　妊娠ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（妊娠15日）.....71
表 2.6.6.A-42　剖検時の血清中及び肝臓中のグラゾプレビル濃度（平均±標準偏差）.....79
表 2.6.6.A-43　安全性の確認が必要なグラゾプレビル不純物及びそのヒト摂取量に対するラット摂取量比.....82
表 2.6.6.A-44　イヌにグラゾプレビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与1日）.....85
表 2.6.6.A-45　イヌにエルバスビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の 血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与1日）.....86
表 2.6.6.A-46　イヌにグラゾプレビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与5週）.....86
表 2.6.6.A-47　イヌにエルバスビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の 血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与5週）.....87
表 2.6.6.A-48　イヌにグラゾプレビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の肝臓中グラゾプレビル濃度（μM）c（平均±標準誤差）（投与5週）.....87
表 2.6.6.A-49　イヌにエルバスビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の 肝臓中エルバスビル濃度（μM）c（平均±標準誤差）（投与5週）.....88
表 2.6.6.A-50　サルにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの PK パラメータ （投与7日）.....89
表 2.6.6.B-1　エルバスビルのマウス、ラット及びイヌにおける反復経口投与毒性試験.....91
表 2.6.6.B-2　マウスにエルバスビルを経口投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与4週）.....92
表 2.6.6.B-3　マウスにエルバスビルを経口投与後の肝臓中エルバスビル濃度（μM）[a]（雌雄合算平均±標準誤差）（投与4週）.....92
表 2.6.6.B-4　雄性ラットにおける血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均）（投与7日）.....93
表 2.6.6.B-5　ラットにエルバスビルを経口投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与2週）.....94
表 2.6.6.B-6　ラットにエルバスビルを経口投与後の肝臓中エルバスビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）（投与3週、剖検時）.....94
表 2.6.6.B-7　ラットにエルバスビルの100 mg/kg/日を経口投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与3週）.....95

Confidential

表 2.6.6.B-8　ラットにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルのTKパラメータ（平均±標準誤差）：（投与13週）.....96
表 2.6.6.B-9　ラットにエルバスビルを投与後の肝臓エルバスビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）：（投与14週、剖検時）.....97
表 2.6.6.B-10　ラットにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルのTKパラメータ（平均±標準誤差）：（投与13週）.....98
表 2.6.6.B-11　ラットにエルバスビルを投与後の肝臓エルバスビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）：（投与27週、剖検時）.....98
表 2.6.6.B-12　イヌにエルバスビル 25 mg/kg/日を投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与1日）.....99
表 2.6.6.B-13　イヌにエルバスビル 25 mg/kg/日を投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与2週）.....99
表 2.6.6.B-14　イヌにエルバスビル 25 mg/kg/日を投与後の個別及び 平均肝臓エルバスビル濃度：（投与15日）.....99
表 2.6.6.B-15　イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ （平均±標準誤差）：（投与1日）.....101
表 2.6.6.B-16　イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ （平均±標準誤差）：（投与5週）.....101
表 2.6.6.B-17　イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ （平均±標準誤差）：（投与13週）.....102
表 2.6.6.B-18　イヌにエルバスビルを投与後の肝臓エルバスビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）：（投与14週、剖検時）.....102
表 2.6.6.B-19　イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ （平均±標準誤差）：（投与1日）.....104
表 2.6.6.B-20　イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ （平均±標準誤差）：（投与4週）.....104
表 2.6.6.B-21　イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ （平均±標準誤差）：（投与13週）.....105
表 2.6.6.B-22　イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの平均パラメータ （平均±標準誤差）：（投与26週）.....105
表 2.6.6.B-23　イヌにエルバスビルを投与後の肝臓エルバスビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）：（投与39週、剖検時）.....105
表 2.6.6.B-24　エルバスビルの生殖発生毒性試験（重要な試験）.....109
表 2.6.6.B-25　血漿中エルバスビル濃度（平均±標準誤差）：GD 15.....111
表 2.6.6.B-26　ウサギにエルバスビルを投与後の母動物の血漿中エルバスビルのTKパラメータ（平均±標準誤差）：GD 15.....113
表 2.6.6.B-27　安全性の確認が必要なエルバスビル不純物及びそのヒト摂取量に対するラ

Confidential

ット摂取量比 117
表 2.6.6.B-28　イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ （平均±標準誤差）:（投与1日） 120
表 2.6.6- 4　グラゾプレビルの全身曝露量に基づいた安全域 123
表 2.6.6- 5　エルバスビルの全身曝露量に基づいた安全域 130

Confidential

略号及び用語の定義

略号	定義	
MK-5172、[redacted]	Grazoprevir	グラゾプレビル
MK-8742、[redacted]	Elbasvir	エルバスビル
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion	吸収・分布・代謝・排泄
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$	Area under the Curve from zero to 24 hours	投与後0から24時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
b.i.d.	Bis in die	1日2回投与
BSEP	Bile salt export pump	胆汁酸トランスポーター
BTAC	Biochemical Toxicology & Analytical Chemistry	Biochemical Toxicology & Analytical Chemistry 研究室
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	Observed maximum concentration	最高血漿中濃度
DAA	Direct-acting antiviral agents	直接作用型抗ウイルス剤
DMPK	Drug Metabolism & Pharmacokinetic	Drug Metabolism & Pharmacokinetic 研究所
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
F	Female	女性/雌性
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価
GD	Gestation day	妊娠日数
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
GLDH	Glutamate dehydrogenase	グルタミン酸脱水素酵素
GT	Genotype	遺伝子型
HCV	Hepatitis C virus	C 型肝炎ウイルス
HPMCP	hydroxypropylmethylcellulose phthalate	ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート
hr	Hour	時間
ICH	International Committee on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IV	Intravenous	静脈内
L	Liter	リットル
LD	Lactation day	授乳日数
LLNA	Local lymph node assay	局所リンパ節アッセイ
LLQ	Lower limit of quantitation	定量下限
M	Male	男性／雄性
mg	Milligram	ミリグラム
mL	Milliter	ミリリットル
MN-PCE	Micronucleated-polychromatic erythrocytes	小核を有する多染性赤血球

Confidential

略号	定義	
MRP	Multidrug resistance-associated protein	多剤耐性関連蛋白質
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
MTT	Methyl thiazol tetrazolium	メチルチアゾールテトラゾリウム
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
NOEL	No-observed-effect level	無作用量
NS	Non-structural protein	非構造蛋白質
OATP	Organic anion-transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
PAS	Periodic acid-Schiff	過ヨウ素酸シッフ
PEG	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
QWBA	Quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
SAA	Serum Amyloid A	血清アミロイド A
SD	Standard deviation	標準偏差
SE	Standard error	標準誤差
SI	Stimulation index	刺激指数
S-9	Liver microsomal enzyme activation system	肝ミクロソーム酵素活性化系
TCA	Taurocholic acid	タウロコール酸
TEM	Transmission electron microscopy	透過電子顕微鏡法
TK	Toxicokinetic	トキシコキネティクス
T_{max}	Time to reach C_{max}	最高血漿中濃度到達時間
TPGS	Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate	トコフェリルポリエチレングリコール1000サクシネート
µg	Microgram	マイクログラム
µM	Micromolar	マイクロモル濃度
UVR	Ultraviolet radiation	紫外線放射
w/v	Weight/volume	重量/容積
w/w	Weight/weight	重量/重量

Confidential

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

グラゾプレビルは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、エルバスビルはHCV NS5Aに対する低分子阻害薬である。HCV genotype（GT）1、3及び4慢性感染患者を対象に開発されたグラゾプレビル／エルバスビルの併用療法は高い有効性と良好な忍容性を有し、簡便（1日1回投与）であり、ペグインターフェロンを必要としない短期投与レジメンが可能である。HCV GT1感染患者に対してはグラゾプレビル／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／エルバスビルの臨床推奨用量は、100 mg/50 mg である。母集団薬物動態解析による日本人 HCV 感染患者（MK-5172-058試験）の定常状態におけるグラゾプレビル及びエルバスビルの血漿中曝露量の個別推定値に基づく $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ の幾何平均値はそれぞれ、4.438 μM·hr 及び2.775 μM·hr であり、対応する C_{max} 値は、0.617 μM 及び0.177 μM であった[2.7.2.3.1.1 項、2.7.2.3.2.1 項]。

グラゾプレビル及びエルバスビル単独の毒性試験については、標準的な組合せの in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験、ラットで最大6ヵ月及びイヌで最大9ヵ月までの反復経口投与毒性試験並びに一連の生殖発生毒性試験が実施されている。CD1マウス及び／又は rasH2野生型マウスを用いて用量設定試験を行い、それぞれのマウスを用いて実施する可能性のあった短期又は長期がん原性試験での投与量を検討したが、臨床で予定されるグラゾプレビル／エルバスビルの併用連続投与期間が6ヵ月未満であり、慢性あるいは再発性の病態の治療において間欠的な方法で頻繁に用いられるものではなく、標準的な組合せの遺伝毒性試験でいずれの遺伝毒性も認められず、慢性毒性試験で増殖性の徴候も認められなかったことから、日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）S1Aガイダンスに従って、がん原性試験は実施しなかった。臨床試験（PN003試験）[資料5.3.5.1.2: 5172P003]において、高用量のグラゾプレビルをペグインターフェロン及びリバビリンと併用投与した患者の一部で、遅発性のトランスアミナーゼ上昇がみられたことから、異なる系統のマウスを用いたグラゾプレビルの単独投与探索試験を追加で実施した。これらの試験は、マウス（高用量でトランスアミラーゼ上昇を示した唯一の動物種）の用量設定試験でみられた肝胆道系の変化を、さらに詳しく調べられるようにデザインした。エルバスビル単独でイヌに1ヵ月間経口投与し、その後3ヵ月間休薬期間を設けた試験を実施し、イヌの反復投与毒性試験においてエルバスビル投与と関連してリンパ系組織内にみられたリン脂質症の回復性について評価した。グラゾプレビル／エルバスビル併用に対する安全性は、イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験により評価した。非臨床試験において、標的器官は異なるものの、イヌはグラゾプレビル又はエルバスビルの投与時に病理組織学的変化が確認された動物種であった。

グラゾプレビル及びエルバスビルの毒性試験の概要を、下記[表 2.6.6-1]に示す。

Confidential

表 2.6.6-1　　実施したグラゾプレビル及びエルバスビル毒性試験一覧

Study Type and Duration	Route	Species/Test System	Study TT# (GLP/Non-GLP)
Grazoprevir			
Single dose toxicity			
Single dose toxicity	Oral	Mouse/CD1(ICR)	[redacted]-6043 (Non-GLP)
Repeat-dose toxicity			
7 days	Oral	Rat	[redacted]-2525 (Non-GLP)
9 days	Oral	Dog	[redacted]-1119 (Non-GLP)
14 days (dedicated to toxicokinetic evaluation only)	Oral	Rat	[redacted]-1102 (Non-GLP)
1 month	Oral	Mouse/rasH2 wild-type	[redacted]-6034 (GLP[a])
		Rat	[redacted]-1152, [redacted]-1120 (GLP)
		Dog	[redacted]-1151 (GLP)
3 months	Oral	Mouse/CD1(ICR)	[redacted]-6038 (GLP[a])
6 months	Oral	Rat	[redacted]-6014 (GLP)
9 months	Oral	Dog	[redacted]-6015 (GLP)
Genotoxicity			
Microbial mutagenesis assay	In vitro	Salmonella typhimurium and Escherichia coli	[redacted]-8000 (Non-GLP) [redacted]-8011 (GLP)
Chromosomal aberration assay	In vitro	Chinese hamster ovary cells	[redacted]-8686 (Non-GLP) [redacted]-8600 (GLP)
Micronucleus induction assay	Oral	Rat	[redacted]-8813, [redacted]-8734 (GLP)

Confidential

表 2.6.6-1　実施したグラゾプレビル及びエルバスビル毒性試験一覧（続き）

Study Type and Duration	Route	Species/Test System	Study TT# (GLP/Non-GLP)
Grazoprevir			
Reproductive & developmental toxicity			
Fertility	Oral	Rat	[redacted]-7260 (GLP)
Embryo-fetal development	Oral	Rat	[redacted]-7055 (Non-GLP) [redacted]-7050 (GLP[b])
Toxicokinetic/Tolerability Study	Oral	Rabbit	[redacted]-7047, [redacted]-7048, [redacted]-7049, [redacted]-7046, [redacted]-7044, [redacted]-7042, [redacted]-7127 (Non-GLP)
	IV	Rabbit	[redacted]-7126 (Non-GLP)
Embryo-fetal development	Oral	Rabbit	[redacted]-7040 (GLP[b])
Embryo-fetal development	IV	Rabbit	[redacted]-7001 (Non-GLP)
Embryo-fetal development	IV	Rabbit	[redacted]-7300 (GLP)
Pre- & postnatal development	Oral	Rat	[redacted]-7010 (GLP)
Local Tolerance			
Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay	In vitro	Isolated Bovine Cornea	[redacted]-7866[†] (GLP[c])
Dermal Irritation	Dermal	Rabbit	[redacted]-7865[†] (GLP[c])
Other Toxicity Study			
Immunotoxicity (LLNA)	Dermal	Mouse	[redacted]-7864[†] (GLP[c])
Mechanistic Study[d]	Oral	Mouse/(rasH2 wild-type)	[redacted]-6034 (Non-GLP)
		Mouse/(C57BL/6 and BALB/c)	[redacted]-6039 (Non-GLP)
		Mouse/(rasH2 wild-type)	[redacted]-9693 (Non-GLP)
		Mouse/(C57BL/6 and BALB/c)	[redacted]-9709 (Non-GLP)
		Rat	[redacted]-9745 (Non-GLP)
		Dog	[redacted]-9746 (Non-GLP)

Confidential

表 2.6.6-1　　実施したグラゾプレビル及びエルバスビル毒性試験一覧（続き）

Study Type and Duration	Route	Species/Test System	Study TT# (GLP/Non-GLP)
Grazoprevir			
Other Toxicity Study (Cont.)			
Phototoxicity	Oral	Rat/Long-Evans	[redacted]-9002[††] (GLP[c])
Combination Toxicity (with elbasvir)	Oral	Dog	[redacted]-6051 (GLP[e])
Exploratory 8-Day Study	Oral	Monkey	[redacted]-1059 (Non-GLP)
Hemolysis	In vitro	Human Whole Blood	[redacted]-7867 (Non-GLP)
Elbasvir			
Repeat-dose toxicity			
7 days	Oral	Rat	[redacted]-2901 (Non-GLP)
14/15 days	Oral	Rat	[redacted]-6014, [redacted]-6017[f] (GLP)
		Dog	[redacted]-6013 (GLP)
1 month	Oral	Mouse/rasH2 wild-type	[redacted]-6047 (GLP)
3 months	Oral	Rat	[redacted]-6024 (GLP)
		Dog	[redacted]-6025 (GLP)
6 months	Oral	Rat	[redacted]-6033 (GLP)
9 months	Oral	Dog	[redacted]-6030 (GLP)

Confidential

表 2.6.6-1　実施したグラゾプレビル及びエルバスビル毒性試験一覧（続き）

Study Type and Duration	Route	Species/Test System	Study TT# (GLP/Non-GLP)
Elbasvir			
Genotoxicity			
Microbial mutagenesis assay	In vitro	Salmonella typhimurium and Escherichia coli	[redacted]-8239[†††] (Non-GLP), [redacted]-8060 (GLP)
Chromosomal aberration assay	In vitro	Chinese hamster ovary cells	[redacted]-8536 (GLP)
Micronucleus induction assay	In vitro	Chinese hamster ovary cells	[redacted]-8688 (Non-GLP)
	Oral	Rat	[redacted]-6014 (GLP), [redacted]-8730 (Non-GLP)
Reproductive & developmental toxicity			
Fertility	Oral	Rat	[redacted]-7290 (GLP)
Embryo-fetal development	Oral	Rat	[redacted]-7175 (Non-GLP), [redacted]-7170 (GLP)
		Rabbit	[redacted]-7185 (Non-GLP), [redacted]-7180 (GLP)
Pre- & postnatal development	Oral	Rat	[redacted]-7020 (GLP)
Local Tolerance			
Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay	In vitro	Isolated Bovine Cornea	[redacted]-7807[†] (GLP[c])
Dermal Irritation	In vitro	EpiDerm™ tissue	[redacted]-7806[†] (GLP[c])

Confidential

表 2.6.6-1　実施したグラゾプレビル及びエルバスビル毒性試験一覧（続き）

Study Type and Duration	Route	Species/Test System	Study TT# (GLP/Non-GLP)
Elbasvir			
Other toxicity studies			
Immunotoxicity (LLNA)	Dermal	Mouse	[redacted]-7805[†] (GLP[c])
Phototoxicity	Oral	Rat/Long-Evans	[redacted]-9042[††] (GLP[c])
Reversibility	Oral	Dog	[redacted]-1031 (GLP)
Combination Toxicity (with grazoprevir)	Oral	Dog	[redacted]-6051 (GLP[e])
Hemolysis	In vitro	Human whole blood	[redacted]-7800 (Non-GLP)

a　With the exception of the determination of the physical stability of the test article, the evaluation of grazoprevir liver/gallbladder concentrations, and transmission electron microscopy which were non-GLP.
b　With the exception of GD 0 body weights and micro-computed tomography which were non-GLP.
c　With the exception of the characterization of the test article which was non-GLP.
d　Conducted in the context of the late elevation of transaminase levels noted in a subset of patients co-administered high doses of grazoprevir with pegylated-interferon and ribavirin in the clinical protocol PN003 [資料5.3.5.1.2: 5172P003].
e　With the exception of the evaluation of grazoprevir liver concentrations which was non-GLP.
f　Limited to toxicokinetic evaluation.
†　Conducted at [redacted], U.S.A.
††　Conducted at [redacted], U.S.A.
†††　Conducted at [redacted], Canada.
IV = Intravenous.

[2.6.7.A.1 項]、[2.6.7.B.1 項]

非臨床試験で用いた被験物質のバッチを[2.6.7.A.4 項]、[2.6.7.B.4 項]に記載する。重要な毒性試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠し[表 2.6.6-1]、ICH ガイダンスに従って実施した。[表 2.6.6-1]に特に記載がない限り、試験は Merck Research Laboratories（West Point, Pennsylvania, U.S.A.）又は Laboratories Merck Sharp & Dohme Chibret, Centre de Recherche（Riom, France）で実施した。米国とフランスは経済協力開発機構（OECD）の加盟国であり、OECD の「データの相互受け入れ」システムが適用される。すべての GLP 準拠試験報告書に GLP 遵守陳述書を添付した。すべての重要な試験は、同一試験内又は同条件下で同調製物を同用量投与した別試験でのグラゾプレビル又はエルバスビルの TK 評価により担保した。[2.6.7.A.2 項]、[2.6.7.A.3 項]、[2.6.7.B.2 項]、[2.6.7.B.3 項]。

グラゾプレビル及びエルバスビルの毒性プロファイルを以下に要約し、それぞれの詳細を A 項及び B 項に記載する。考察／結論の項では両化合物について統合して考察を行った。

グラゾプレビル毒性プロファイル

ICH S2A、S2B 及び最新の ICH S2 (R1)ガイダンスで推奨されている標準的な一連の遺伝毒性試験として細菌を用いる復帰突然変異試験、in vitro 染色体異常試験及び in vivo 小核試験を実施した。In vitro 試験の最高濃度は、限界量（細菌を用いる復帰突然変異試験）又は細胞毒性により制約される濃度（染色体異常試験）であった。In vivo 試験の最大投与量は、限界量（1000 mg/kg）又は到達可能な最大曝露量が得られる用量（200 mg/kg の1日2回投与）であった。

Confidential

独立した単回投与毒性試験は実施していないが、マウスに最大500 mg/kg/日まで、ラットに最大1000 mg/kg/日まで［全身曝露量の最高値は200 mg/kg b.i.d.（400 mg/kg/日）投与時］及びイヌに最大600 mg/kg/日まで経口投与した反復投与毒性試験を用いて、ICH M3 (R2)ガイダンスに従って急性毒性を評価した。いずれの動物種においても、死亡は認められず、急性毒性を示唆する変化はみられなかった。したがって、概略の致死量は、雌雄マウスで500 mg/kg 超、雌雄ラットで1000 mg/kg 超、雌雄イヌで600 mg/kg 超であった。

ラット及びイヌの反復投与毒性試験並びに rasH2野生型マウス／CD1マウスの用量設定試験を実施し、グラゾプレビルの毒性プロファイルを評価した。ラット／イヌ反復投与毒性試験及びマウス用量設定試験から得られた無毒性量（NOAEL）より算出した安全域を[表 2.6.6-2]に示す。

表 2.6.6-2　グラゾプレビルの全身曝露量に基づいた安全域

	NOAEL mg/kg/day	**Toxicokinetic Values at NOAEL**		**Safety Margins to the Clinical Dose[a]**	
		$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ μM·hr	C_{max} μM	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$	C_{max}
Mouse (rasH2 wild-type) (1 month)[b]	100	164	40.8	37X	66X
Mouse (CD1(ICR)) (3 months)[c]	200	820	56.3	185X	91X
Rat (6 months)[d]	200 b.i.d.	445	32.8	100X	53X
Dog (9 months)[e]	15	367	34.4	83X	56X

[a] Calculations based on ratio of daily exposure ($AUC_{0\text{-}24\ hr}$) and C_{max} in nonclinical species to the respective daily exposure ($AUC_{0\text{-}24\ hr}$) and C_{max} in Japanese HCV-infected patients at the recommended daily clinical dose of grazoprevir, 100 mg, when co-administered with elbasvir, 50 mg. The $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ and C_{max} in Japanese HCV-infected patients are the geometric mean steady state $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ and C_{max} calculated from individual estimates by population PK analysis respectively from clinical protocol MK-5172-P058.
[b] Study TT#[redacted]-6034 [Sec. 2.6.7.A.7A].
[c] Study TT#[redacted]-6038 [Sec. 2.6.7.A.7B].
[d] Study TT#[redacted]-6014 [Sec. 2.6.7.A.7E].
[e] Study TT#[redacted]-6015 [Sec. 2.6.7.A.7G].

rasH2野生型マウス（1ヵ月間投与）及び CD1マウス（3ヵ月間投与）を用いて用量設定試験を行い、実施する可能性のあったマウスのがん原性試験で使用するべき系統及び投与量を検討した。両用量設定試験では、20、100、200及び500 mg/kg/日の投与量で評価を行った。rasH2野生型マウスの1ヵ月間用量設定試験において、投与期間中に100 mg/kg/日以上の群の雌雄で、投薬に関連した変化がみられた。500 mg/kg/日群で、雌雄で体重の減少が、雌で総白血球数及びリンパ球数の中等度の減少（それぞれ-37%及び-43%）が、雄で総白血球数、好中球数、リンパ球数及び好酸球数の増加（それぞれ+63、+53、+61及び、+350%）が、雌雄で赤血球数の軽度な増加、その他の赤血球系パラメータの軽度な減少、血小板数の軽度な増加がみられた。血清生化学的検査では、雌雄で総／直接ビリルビン（最高47倍）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST；最高

Confidential

2倍)、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT ; 最高5倍）及びアルカリホスファターゼ（ALP ; 2倍未満）の増加が、雌雄で血清中総蛋白、アルブミン及びグロブリンの軽度な減少並びにグルコース、リン及びコレステロールの軽度な増加が、雄1例で血液尿素窒素の軽度な増加がみられた。200 mg/kg/日群で、雌で総白血球数及びリンパ球数の中等度な減少（いずれのパラメータにおいても-41%）が、雄で血小板数の軽度な増加がみられた。これらの血清生化学的検査でみられた変化は、500 mg/kg/日群でみられた変化とほぼ同様であったが、重症度は低下していた。100 mg/kg/日群の投薬に関連した変化として、雌で総白血球数及びリンパ球数の軽度な減少が、雌雄でコレステロールの軽度な増加が、雄1例で総ビリルビンの軽度な増加がみられた。剖検・病理組織学的検査において、投薬に関連した所見が雌で100 mg/kg/日以上の群で、雄で200 mg/kg/日以上の群でみられた。500 mg/kg/日群で、雌雄で腎尿細管上皮の変性、小腸における絨毛の萎縮及びごく軽度～軽度の肝細胞サイズの増大が、雌で門脈周囲部における肝細胞細胞質の淡明化［PAS（Periodic Acid-Schiff) 染色及び透過型電子顕微鏡（TEM）により確認された肝細胞におけるグリコーゲン量の増加と一致］がみられた。肝細胞サイズの増大は、雌雄で認められた肝重量の増加及び肝臓サイズの増大（雄では小葉構造の明瞭化）と関連していた。200 mg/kg/日群で、肝細胞サイズの増大（雄のみ）及び肝重量の増加がみられたが、500 mg/kg/日群と比較して全体的にその程度及び発現頻度は低下していた。100 mg/kg/日群では、雌で肝重量の増加がみられた。500 mg/kg/日群の雌雄及び200 mg/kg/日群の雄2例で前述以外の病理組織学的変化がみられたが、これらは、当該動物の一般状態の悪化に起因するものと考えられた。

以上の結果から、100 mg/kg/日群で認められた変化は、軽度の臨床病理学的変化及び肝重量の増加のみであり、病理組織学的変化を伴わなかったことから、これらの所見の毒性学的意義は低いと考えられた。よって、rasH2野生型マウスの1ヵ月間用量設定試験の NOAEL は100 mg/kg/日であった。100 mg/kg/日の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝164 μM·hr）は HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約37倍に相当する。

CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験において、投薬に関連した計画外の死亡が投与15日に500 mg/kg/日群の1例でみられた。死亡例以外の動物でみられた投与期間中の投薬に関連した変化は、rasH2野生型マウスの1ヵ月経口投与用量設定試験でみられた所見とほぼ同様であり、その程度は rasH2野生型マウスでみられた所見よりおおむね低かった。200 mg/kg/日以下の投与群で、対照群と比較して総ビリルビン（最高3倍)、ALP（2倍未満)、ALT（2倍未満）及びグルコースの軽度な増加がみられた。これらの変化は、軽度で病理組織学的変化を伴わなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。剖検・病理組織学的検査において、200 mg/kg/日以上の群で投薬に関連した所見がみられた。本試験でみられた腎臓及び肝臓所見は、rasH2野生型マウスの1ヵ月経口投与用量設定試験でみられた所見とほぼ同様であった。さらに、500 mg/kg/日群の雌雄各1例で胆嚢に限局性の炎症が認められた。200 mg/kg/日群で、門脈周囲部における肝細胞細胞質の淡明化を伴うごく軽度～軽度の肝細胞サイズの増大が肝重量の増加に関連してみられたが、これらの程度が軽度であり、壊死あるいは炎症がみられていないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

以上の結果から、CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験の NOAEL は200 mg/kg/日であっ

Confidential

た。200 mg/kg/日の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝820 μM·hr）はHCV感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約185倍に相当する。

ラットの全身曝露量の最大値は200 mg/kg b.i.d.（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝445 μM·hr、1日総投与量は400 mg/kg/日）で得られたが、限界量（1000 mg/kg/日）での全身曝露量は24.3 μM·hr と低かった。1000 mg/kg/日でみられた低い全身曝露は、高用量投与液の物性（懸濁液）により吸収が制限されたことによると考えられた。グラゾプレビルの溶液は懸濁液と比較して良好な吸収を示し、溶液での投与可能な最高用量である200 mg/kg を1日2回投与することで到達可能な最大曝露量を得ることができた。ラットに最大6ヵ月間、50及び200 mg/kg/日の1日1回あるいは200 mg/kg の b.i.d.（1日総投与量：400 mg/kg/日）で投与し、毒性プロファイルを評価した。投与期間中の投薬に関連した所見として、すべての投薬群で投与後に一過性の流涎が、200 mg/kg/日の雌1例及び200 mg/kg b.i.d.群の雌雄で血清中総ビリルビンのごく軽度な増加（200 mg/kg/日の雌1例：雌対照群での最高値が0.2 mg/dL に対して0.3 mg/dL、200 mg/kg b.i.d.群の雌雄：対照群での最高値が0.2 mg/dL に対して、雌15例中4例及び雄15例中2例で0.3又は0.4 mg/dL）が、200 mg/kg b.i.d.群の雌でナトリウム、クロライド及びカリウム平均値の軽度な減少がみられた。流涎は、ほぼ投与直後に観察され、程度はごく軽度で一過性であることから、本化合物が中枢を介して及ぼした影響ではなく、嗜好上の理由によるものと考えられ、毒性学的意義は低いと考えられた。血清生化学的検査でみられた所見も、その程度が軽度で病理組織学的変化を伴わなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。病理組織学的検査では、200 mg/kg b.i.d.群の雄で腺胃粘膜に限局性出血がみられた。200 mg/kg b.i.d. 群の全身曝露量は雄（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ ＝ 525 ± 168 μM·hr）と雌（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ ＝ 365 ± 81.7 μM·hr）で同程度であり、更に、200 mg/kg/日群の全身曝露量（1日1回；$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝419 ± 68.4 μM·hr）とも同程度であることから、限局性出血は1日2回投与により胃粘膜へのグラゾプレビルの直接接触時間が長期化したため生じたと考えられた。200 mg/kg b.i.d.群において、雄が雌よりも体重が重いため、より大量の投与液を投与されたため、性差が生じたと考えられた。6ヵ月間投与後に、腺胃粘膜に出血がみられたラットの胃において慢性変化は認められなかったことから、雄のみで認められた本所見の毒性学的意義は低いと考えられた。以上の結果から、ラットの NOAEL は、200 mg/kg b.i.d.（1日総投与量：400 mg/kg/日）以上であった。200 mg/kg b.i.d.の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 445 μM·hr）は HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの曝露量の約100倍に相当する。

イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験を5、20及び600 mg/kg/日の投与量で実施した。600 mg/kg/日群で、嘔吐、赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン、網状赤血球及びヘマトクリット）の軽度な減少、軽度～中等度の総ビリルビンの増加（対照群と比較して最高5倍）及び精上皮の変性がみられた。これらの変化はほとんど有害ではないと考えられた。嘔吐は動物の一般状態に影響を与えず、血液検査所見の程度はごく軽度で病理組織学的変化を伴わなかった。ビリルビン増加は肝毒性を示す他のバイオマーカーの変化（AST、ALT 及び／又は ALP の増加）や、関連した病理組織学的変化を伴わなかった。また、全例にみられた精上皮の変性は程度がごく軽度～軽度であり、回復性がある[資料4.3: 1]と考えられた。20 mg/kg/日群の雄1例で総ビリルビンのごく軽度な増加（試験前値と比較して2倍）がみられたが、その程度は軽く、肝毒性を示す他のバイオマー

Confidential

カーの変化（AST、ALT 及び／又は ALP の増加）や、関連した病理組織学的所見を伴わなかったことから、毒性学的な意義は低いと考えられた。以上の結果から、イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験の NOAEL は20 mg/kg/日であった。20 mg/kg/日の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝497 μM·hr）は HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約112倍である。

イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験の結果に基づいて、9ヵ月間経口投与毒性試験の投与量を5、15及び300 mg/kg/日に設定した。300 mg/kg/日群において、摂餌量の減少又は食欲不振による過度の体重減少並びに一般症状の変化がみられたことから、雄1例及び雌1例を早期屠殺し、投与12週に投与量を300 mg/kg/日から100 mg/kg/日に減量した。摂餌量及び体重の減少に加え、300 mg/kg/日群では、対照群と比較して無形便／液状便（雌）と投与後の嘔吐の増加、糞便の褪色（黄色）、1例において皮膚及び結膜の黄色化、赤血球系パラメータの軽度な減少、フィブリノーゲン及び血小板の軽度な増加、総ビリルビンの中等度～重度の増加（対照群と比較して最高11倍高値、多くの動物で直接ビリルビンが増加）、ALP 活性の軽度な上昇（4倍未満、雄）、コレステロールの軽度な減少並びに尿中ビリルビンの軽度な増加がみられた。100 mg/kg/日群で、投与27週間にみられた所見は、300 mg/kg/日投与時の11週間にみられた所見とほぼ同様であった。すなわち、無形便／液状便及び投与後の嘔吐の増加（雌）、糞便の褪色（黄色）、体重減少及び不十分な摂餌／食欲不振（雄1例）が認められ、血液検査、生化学的検査、尿検査におけるパラメータに関しては、300 mg/kg/日投与時と性質及び程度ともにほぼ同様の変化が認められた。100 mg/kg/日群ではさらに、赤血球系パラメータの軽度な減少に伴い、平均赤血球数（38週目、雄）及び／又は網状赤血球数の平均値／個別値の増加、並びに数例において有核赤血球の出現がみられ、これらは再生性の反応である可能性が示唆された。剖検・病理組織学的検査では、300/100 mg/kg/日群で、生存例及び早期屠殺した雌雄2例において、投与に関連した変化がみられた。肉眼検査では、同群の全生存例で胆汁の増加を伴う胆嚢の拡張がみられた。また、同群の雄3例中2例で歯肉粘膜、白色脂肪組織及び／又は大動脈の黄色化がみられたが、病理組織学的検査でこれら所見に関連した特異的な変化はみられなかった。器官重量測定では、雌雄で肝重量平均値の増加（病理組織学的検査で関連した特異的な変化なし）及び雄で精巣重量平均値の減少が認められた。病理組織学的検査では、肝臓、胆嚢、精巣、精巣上体、脾臓及び骨髄に変化がみられた。肝臓では類洞細胞におけるごく軽度～軽度の色素沈着（ヘモジデリン）が雌雄で、大型胆管内腔におけるごく軽度の微石症が雌1例でみられた。ごく軽度な微石症は、雌雄で胆嚢内腔でもみられた。胆管及び胆嚢に、これら微石症に関連した病理組織学的な変化はみられなかった。脾臓では、雄で色素沈着（ヘモジデリン）の増加が、雌雄で髄外造血の増加がみられた。骨髄においては雄1例で赤血球系細胞の過形成がみられ、これは、血液検査における赤血球系パラメータにみられた変化と関連すると考えられた。雄性生殖器に関して、精細管の中等度～重度の変性がみられ、これは精巣重量の減少と関連していた。精巣上体管に変化は認められないものの、管腔における精子数が極度に減少していた。生存例で認められたほとんどの所見は、胆管及び胆嚢の微石症を除き、計画外の早期屠殺例でも認められた。さらに、早期屠殺した雄で、骨髄における色素沈着（ヘモジデリン）、骨髄過形成及び十二指腸における限局性炎症がみられた。早期屠殺例の一般状態悪化の原因は特定できなかった。早期屠殺例の雄及び雌の $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ は、それぞれ3610及び3240 μM·hr であり、これは、

Confidential

生存例のうちの数例よりも低かった（最大 $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ ＝ 5540 μM·hr）。以上、300/100 mg/kg/日は、最大耐量（MTD）を超える用量であったが、本投与量で示された毒性は、曝露比が高いことから、ヒトへのリスクとはならないと考えられた。300/100 mg/kg/日の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝2300 μM·hr）は HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約518倍に相当する。

15 mg/kg/日群では、総ビリルビンの増加（ごく軽度～軽度、雌雄、対照群と比較して最高3倍）、胆嚢及び大型胆管内腔における微石症（ごく軽度、雌1例、病理組織学的検査で所見なし）、精巣重量の減少に関連した精細管の変性（ごく軽度、雄1例）が認められた。ビリルビンの増加はごく軽度～軽度なものであり、肝毒性を示す他のバイオマーカー（AST、ALT 又は ALP 増加）に変化がみられないこと、本所見に関連する病理組織学的な変化が認められていないことから、本所見の毒性学的意義は低いと考えられた。胆嚢及び大型胆管内腔でみられた微石症はごく軽度なものであり、胆嚢及び肝臓に病理組織学的な変化が認められていないことから、本所見の毒性学的意義は低いと考えられた。雄1例で認められた精巣における所見はごく軽度なものであり、精原細胞より成熟した精子細胞のみの減少がみられる一方、セルトリ細胞及びライディッヒ細胞に顕著な変化は認められず、回復性を有することが予測される[資料4.3: 1]。また、精巣上体では、病理組織学的な変化は認められず、精巣上体における精子数にも影響はみられなかったことから、精巣における変化はごく軽度な変化であり、本所見の毒性学的意義は低いと考えられた。以上の結果から、イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験の NOAEL は15 mg/kg/日であった。15 mg/kg/日の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝367 μM·hr）は HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約83倍に相当する。5 mg/kg/日群では投与に関連した変化は認められなかった。5 mg/kg/日の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝69.3 μM·hr）は HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約16倍に相当する。

臨床試験（PN003試験）[資料5.3.5.1.2: 5172P003]において、高用量のグラゾプレビルをペグインターフェロン及びリバビリンと併用した患者の一部で、遅発性のトランスアミナーゼ上昇が認められたことから、rasH2野生型マウス、並びに rasH2野生型の親系統である C57BL/6及び BALB/c マウスを用いて探索試験を実施した。マウスはトランスアミナーゼの上昇を示した唯一の動物種であり、rasH2野生型マウスはトランスアミナーゼの上昇を最も顕著に示した系統であった。本試験の目的は、rasH2野生型マウスの用量設定試験でみられたトランスアミナーゼの上昇を含む肝胆道系の変化を更に検討し、臨床試験でみられた安全性所見を非臨床モデルで再現できるかどうかを検討することであった。

これらの評価項目を検討するため、rasH2野生型マウスの12週間経口投与探索試験及び12週間回復性試験を実施した。投与期間は、臨床試験（PN003試験）[資料5.3.5.1.2: 5172P003]での投与期間と同様とした。12週間の無処置回復期間にわたり、投与期間中に認められた変化の回復性を評価した。投与量は、200及び500 mg/kg/日とした。血清生化学的検査では、アルブミン、AST、ALT、ALP、グルタミン酸脱水素酵素（GLDH）及び総／直接ビリルビンについてのみ評価した。剖検はグラゾプレビル投与から約2、4、8及び12週後並びに12週間の無処置回復期間終了時に実施した。病理組織学的検査は、肝臓、胆嚢、小腸、大腸及びパイエル板（腸の切片に認められた場合）に

Confidential

ついて実施した。

投与期間中、500 mg/kg/日群で投与4日に死亡が、200 mg/kg/日以上の群では忍容性が低く、体重増加量の減少（病理組織学的変化を伴う）が認められた。200 mg/kg/日以上の群での血清生化学的検査における変化は、rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験での変化とその性質及び程度ともほぼ同様であった。これらの所見は投与開始約2週間後に採取した最初の検体から認められたが、投与期間中にその程度は進行せず、休薬開始約8週間後には回復がみられた。剖検・病理組織学的検査では、肝臓に、用量依存的な肝細胞サイズの増大、肝重量の増加、肝臓サイズの増大及び肝細胞細胞質の淡明化がみられ、これらの所見は、rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験での変化とその性質及び程度ともに類似していた。肝の炎症、変性又は壊死は認められなかった。これらの肝臓所見は、12週の回復期間終了時に回復がみられた。rasH2野生型マウスの1ヵ月間試験でみられた肝臓所見に加えて、本試験では200 mg/kg/日以上の群で胆嚢所見が認められた。胆嚢における好中球性細胞浸潤が500 mg/kg/日群の雌雄（雌：ごく軽度～中等度、雄：ごく軽度～軽度）及び200 mg/kg/日群の雌数例（ごく軽度）で認められた。ごく軽度のびらんが500 mg/kg/日群の雌雄少数例でのみ認められ、この多くは好中球性細胞浸潤に関連した。500 mg/kg/日群の雄1例で、胆嚢壁の限局性壊死（ごく軽度）及びそれに隣接した肝臓組織の限局性壊死がみられ、本所見は限局性のびらん性変化が進行したものである可能性がある。500 mg/kg/日群の雌雄で胆嚢上皮の過形成（ごく軽度～軽度）が投与の約8週間後に認められた。これらの胆嚢所見は、12週の回復期間終了時に回復がみられた。

肝胆道系の変化の他に、小腸（先に実施した1ヵ月間用量設定試験で特定された標的器官）にも所見が認められた。多くの所見は十二指腸に限局しており、絨毛の萎縮が500 mg/kg/日群で、上皮の空胞化が200 mg/kg/日以上の群でみられた。これらの上皮変化は、まれに空腸にもみられたが、小腸（回腸）及び大腸（盲腸、結腸）のいずれにもみられなかったことから、投薬の局所作用に関連する可能性が考えられた。空腸以降の腸管でも腸血流があるため細胞間の薬物濃度は十二指腸と同様のはずであるが、胆汁流入部位から遠位であるため腸管内濃度が低くなると考えられ、この理由で被験物質の局所的な刺激性が裏付けられると考えられた。さらに、腸変化は、投与期間中に、その発症率及び程度が時間とともに増加することなくおおむね認められ、12週の回復期間終了時には回復がみられた。精巣重量の減少が投与12週の剖検時に500 mg/kg/日群の1例で認められたが、12週以前に実施した剖検では認められず、12週の回復期間終了時に回復がみられた。本試験の目的は、以前に実施した同動物種／系統のより短期試験で認められた肝胆道系変化について探索することであったため、雄性生殖器の病理組織学的検査は実施しなかった。

結論として、本試験でみられた肝胆道系の変化は、rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-6034）[2.6.7.A.7A 項]又は CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-6038）[2.6.7.A.7B 項]でみられた所見と一致していた。血清生化学的変化（AST、ALT、ALP 又はビリルビンの増加など）は、投与期間に応じて進行せず、回復期間8週後以降は完全に回復した。肝臓の病理組織学的変化は、投与期間中は進行せず、完全に回復した。胆嚢の病理組織学的変化は、投与期間に応じて程度がわずかに進行したが、回復期間終了時には完全に回復した。

Confidential

肝胆道系の変化に対するマウス系統による感受性の差について更に検討するため、rasH2野生型マウスの親系統である BALB/c マウス及び C57BL/6マウスの1ヵ月間探索毒性試験を実施した。本試験における投与量は、200及び500 mg/kg/日とした。血清生化学的検査、剖検及び病理組織学的検査として、肝胆道系に関連する検査を限定して実施した。両系統において、投薬に関連した計画外の死亡が500 mg/kg/日群で投与4日（C57BL/6マウス）及び投与9日（BALB/c マウス）に認められ、一般状態の悪化を示唆する一過性の病理組織学的変化を伴った体重増加量の変化が認められた。血清生化学的検査でみられた200及び500 mg/kg/日群の変化は、rasH2野生型マウスで認められた変化プロファイルと同様であったが、程度はより低かった。例えば、両系統における ALT の増加は最高でも2倍であり AST の増加は伴わなかったが、rasH2野生型マウスでは ALT の増加は最高4倍であり AST の増加も最高2倍であった。剖検・病理組織学的検査の所見は、rasH2野生型マウスで認められた所見とそのプロファイル及び程度ともに概して同様であったが、さらに本試験では、限局性肝壊死が BALB/c マウスで雌雄の両投与群（200 mg/kg/日群：ごく軽度～軽度、500 mg/kg/日群：中等度まで、雌でのみ関連した混合性細胞浸潤あり）で認められた。本所見の原因は不明であるが、BALB/c マウスでの肝臓中グラゾプレビル濃度が高いことが原因とは考えられない。なぜならば、グラゾプレビル投与から約24時間後の肝臓中濃度又は肝胆嚢中濃度は、BALB/c マウス（200 mg/kg/日群：116 μM、500 mg/kg/日群：187 μM）より、rasH2野生型マウス（200 mg/kg/日群：169 μM、500 mg/kg/日群：490 μM）及び C57BL/6マウス（200 mg/kg/日群：143 μM、500 mg/kg/日群：291 μM）のほうが高かった。さらに、BALB/c マウスではいずれの用量でも AST の増加はみられず、ALT の増加も500 mg/kg/日群の雄でのみみられたことから、BALB/c マウスの両群でみられた限局性肝壊死は AST 又は ALT の増加と関連しなかった。

異なるマウス系統を用いた探索試験では、トランスアミナーゼの増加に関しては、rasH2野生型マウスで最も感受性が高かった。しかし、本マウスモデルは、臨床試験（PN003試験）[資料5.3.5.1.2: 5172P003]でみられた遅発性のトランスアミナーゼ上昇に対して必ずしも最適な非臨床モデルとは言い切れない。本マウスにおけるトランスアミナーゼ上昇は投与初期から認められ、進行せず、投与期間中に回復しなかった。一方、臨床試験（PN003試験）において高用量グラゾプレビル（400 mg 以上）をペグインターフェロン及びリバビリンと併用時の患者で認められた一過性のトランスアミナーゼ上昇は、ほとんどの場合投与開始から約8週以降に認められ、また、患者の投与期間中に回復した。

膜ベシクルを用いた in vitro アッセイにおいて、グラゾプレビルはヒト胆管膜トランスポーターである胆汁酸トランスポーター（BSEP）、多剤耐性関連蛋白質（MRP）2、MRP3、MRP4、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1及び OATP1B3を阻害し、それぞれの IC_{50}値は、0.15、2.5、3.8、1.0、0.7及び1.1 μM であった[2.6.4.A.7.2 項]。グラゾプレビルの胆管膜トランスポーター阻害により、胆汁酸が肝臓中又は血清中に蓄積する可能性や、肝臓又は回腸の胆汁酸輸送及び代謝遺伝子の転写が影響を受け、非臨床動物種でみられた肝胆道系の変化に関与する可能性について検討するため、マウス、ラット及びイヌのメカニズム試験を実施した。マウス（rasH2野生型、C57BL/6及び BALB/c）、ラット及びイヌの血漿中及び／又は肝臓中胆汁酸濃度及び、マウス（rasH2野生型、C57BL/6及び BALB/c）の肝臓又は回腸の胆汁酸輸送及び代謝遺伝子の転写量の変化につ

Confidential

いて検討した。前述の評価の他に、rasH2野生型マウスにおいて、肝障害及び炎症性バイオマーカー［血清 miRNA 種（miR 122及び miR 192）、High Mobility Group Box-1（HMGB1）、血清アミロイド A（SAA）及び／又はサイトカイン］についても評価した。

rasH2野生型マウスにおいて、500 mg/kg/日群で、血清中及び肝臓中のタウリン抱合胆汁酸の増加［血清：タウロコール酸（TCA）が雄で最高39倍、雌で最高9倍、肝臓：TCA が雄でのみ最高2倍）、血清中総遊離型胆汁酸の増加（最高19倍）、及び肝臓の胆汁酸輸送及び代謝に関連したいくつかの遺伝子の発現に変化がみられた。200 mg/kg/日群で、肝臓の胆汁酸輸送及び代謝に関連したいくつかの遺伝子の発現に変化がみられた。これらの変化は、本試験の投与期間全体を通じてみられ、用量に関連したが、概して投与期間に依存した変化の増大はみられなかった。炎症性バイオマーカーの評価において、500 mg/kg/日群で、SAA 及び特定のサイトカイン評価項目（GRO/KC 及び IL-6）が散発的に増加した。SAA 及び評価したサイトカインは、肝臓に特異的ではないものの血清の炎症性バイオマーカーであり、SAA 及び血清中サイトカインの増加は胆嚢又は小腸でみられた回復性の炎症に関連する可能性が考えられる。12週間の回復期間終了時、血清中胆汁酸値を除き、評価を実施したすべてのパラメータに投薬に関連した変化はみられなかったことから、前述の変化は完全に回復性があることが示された。高用量群の雌における胆汁酸値も対照群の胆汁酸値にまで回復したが、高用量群の雄については、最高値からは低下したものの対照群と比較して高値を維持し、回復する傾向にとどまった。これは、投与期間中における血清胆汁酸の増加の程度が雄において最高であったことから考えると、想定内と考えられる。

C57BL/6及び BALB/c マウスにおいて、500 mg/kg/日群で、複数の血清中タウリン抱合胆汁酸種の増加（TCA：C57BL/6マウス雌で5.5倍、C57BL/6マウス雄で3.3倍、BALB/c マウス雄で3倍）がみられた。また、両系統にまた多くの場合雌雄で、肝臓の胆汁酸輸送及び代謝に関連したいくつかの遺伝子の発現に変化がみられた。200 mg/kg/日群の両系統において肝臓の胆汁酸輸送及び代謝に関連したいくつかの遺伝子の発現に変化がみられた。

血清中胆汁酸濃度について、ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験の対照群と高用量群（200 mg/kg b.i.d.；1日総投与量400 mg/kg）及びイヌの9ヵ月間経口投与毒性試験の対照群と高用量群（300/100 mg/kg/日）の血清を用いて測定した。ラットにおいて、対照群と比較して高用量群で血清中遊離型又は抱合胆汁酸に変化はみられなかった。イヌにおいて、300 mg/kg/日群で、総タウリン抱合胆汁酸の増加（最高12倍、TCA は最高13倍）及び総遊離型胆汁酸の増加（最高7倍）がみられた。高用量群の投与量を100 mg/kg/日に減量後も胆汁酸の増加は継続してみられたが、その程度は低下し、総タウリン抱合胆汁酸の増加は最高5倍（TCA は最高6倍）、総遊離型胆汁酸の増加は最高5倍であった。

胆汁酸［総タウリン抱合胆汁酸（主に量が最多である TCA）及び遊離型胆汁酸］の増加は、マウス（rasH2野生型、C57BL/6及び BALB/c）及びイヌでみられたが、ラットではみられないことが示された。マウス及びイヌでみられたこれらの胆汁酸増加は、ラットの最大曝露量よりもおおむね高い血漿又は肝臓曝露量となる用量で認めたことが、ラットでは胆汁酸の増加がみられなかった理由と思われる。さらに、試験を実施したマウスの全系統の肝臓において、胆汁酸の輸送及び代謝に関連した遺伝子発現に変化がみられた。このような変化を引き起こす化合物の情報が十

Confidential

分に得られていないため確定的ではないが、マウス及びイヌにおいて HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときよりも大幅に高い曝露量（rasH2野生型マウス及びイヌでそれぞれ約75倍及び約518倍）では in vivo で胆汁酸トランスポーターに作用することが示唆された。

非臨床動物種において、グラゾプレビル投与に関連した血清中胆汁酸の変化と肝臓変化（トランスアミナーゼ増加を含む）との間に関連がある可能性は低いと考えられる。血清中胆汁酸の増加を示したイヌにおいて、肝臓の炎症又は壊死、並びにトランスアミナーゼの増加はみられず、限局性肝壊死を示した BALB/c マウスの雌において、血清胆汁酸の増加はみられなかった。

非臨床動物種において、グラゾプレビル投与に関連した血清中胆汁酸と胆管所見の関連性、特に総／直接血清ビリルビンの顕著な増加と胆嚢又は胆管の病理組織学的変化との間の関連性があることを示す証拠は限られている。しかし、血清胆汁酸の変化を示した動物種であるマウス及びイヌは、胆嚢又は胆管の病理組織学的変化や総／直接血清ビリルビンの顕著な増加が観察された種であることからも、この関連性は無視できない。ただし、マウス及びイヌでみられた胆管変化に関しては、反復投与毒性試験での NOAEL から算出した安全域が高い（rasH2野生型マウスで約37倍、CD1マウスで約185倍、イヌで約83倍）ことから、ヒトへの外挿性はないものと考えられた。

ICH S1A ガイダンスに従って、臨床で予定されるグラゾプレビルの投与期間が6ヵ月未満であり、標準的な組合せの遺伝毒性試験でいずれの遺伝毒性も認められず、慢性毒性試験で増殖性の徴候の証拠は得られなかったことから、がん原性試験は実施しなかった。

ラットの生殖発生毒性試験では、ラットに最大200 mg/kg b.i.d.まで投与後、雌雄ラットの受胎能パラメータに投薬に関連した変化はみられなかった。高用量群の全身血漿曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）は212 μM·hr（1ヵ月間経口投与毒性試験の投与4週後の測定結果から引用）であり、HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約48倍に相当する。

器官形成期の妊娠ラット又は妊娠ウサギにグラゾプレビルを投与した結果、催奇形性はみられなかった。ラットの胚・胎児発生毒性試験において、妊娠ラットにグラゾプレビルを50及び200 mg/kg/日を1日1回あるいは200 mg/kg b.i.d.経口投与した結果、最高用量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝217 μM·hr、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約110倍に相当）まで、母動物及び胚・胎児に投薬に関連した変化はみられなかった。ウサギの胚・胎児発生毒性に関する経口投与探索試験において、妊娠ウサギに媒体として100%ポリエチレングリコール（PEG）400を使用しグラゾプレビルの50及び200 mg/kg/日を1日1回あるいは200 mg/kg b.i.d.投与した。全身曝露量は3.61 μM·hr までしか到達せず、1日2回投与した媒体対照群及び200 mg/kg b.i.d.群の母動物では、過度の PEG 400（2 mL/kg/日）を投与したことに関連した毒性がみられた。そのため、ウサギの胚・胎児発生毒性試験では、ナノ粒子懸濁液の静脈内投与を実施した。ウサギの胚・胎児発生毒性に関する静脈内投与探索試験において、200 mg/kg/日群で母動物2例に用量制限毒性となる死亡がみられ、本投与群への投与を中止した。ウサギの胚・胎児発生毒性に関する本試験（静脈内投与）において、妊娠ウサギに25、50及び100 mg/kg/日を静脈内投与した場合、母動物及び胚・胎児発生に対する無作用量（NOEL）は100 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝76.1 μM·hr、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約17倍に相当）以上であった。ラットの出生後の発生毒性に関する試験において、F_0母ラットに25及び100 mg/kg/日を1日1回あるいは200 mg/kg を b.i.d.投与

Confidential

した結果、いずれの投与群においても F_0及び F_1世代に投薬に関連した変化はみられなかった。母動物における最大全身曝露量は100 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝155 μM·hr）であり、これは HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約35倍に相当する。

グラゾプレビルは波長領域290～700 nm の光の吸収を示すことから[3.2.S.3.1項（グラゾプレビル）]、有色ラットの光毒性試験（投与量：50 mg/kg/日及び200 mg/kg b.i.d.）を実施した。本試験において眼及び皮膚に投薬に関連した所見はみられなかったため、グラゾプレビルが光毒性を有する可能性は低いことが示唆された。

上記の重要な試験以外の試験として、眼及び皮膚刺激性試験、局所リンパ節試験、溶血性試験及びアカゲザルの忍容性試験（HCV 感染チンパンジーを用いた薬理試験における用量設定を裏付けるための試験）を実施した。いずれの試験においても、重要な毒性学的所見はみられなかった。グラゾプレビルは、眼及び皮膚刺激性試験において無刺激性と分類され、マウス局所リンパ節試験において皮膚感作性はないことが示された。IV 用調製物を用いた吸収、分布、代謝、排泄（ADME）に関する臨床試験を裏付けるために実施した溶血性試験において、グラゾプレビルの IV 用調製物は、ヒト赤血球に溶血を引き起こさなかった。サル忍容性試験において、投薬に関連したいずれの変化もみられなかった。

以上、グラゾプレビルの一般毒性プロファイル、特定の標的器官毒性、遺伝毒性及び生殖発生毒性を一連の in vivo 及び in vitro 試験により評価した結果、グラゾプレビルの毒性学的プロファイルを十分に特徴づけることができた。全体として、グラゾプレビルの主要標的器官は、肝胆道系（マウス、ラット及びイヌ）、雄性生殖器（マウス及びイヌ）、消化管（マウス、ラット及びイヌ）、腎臓（マウスのみ）及び脾臓／骨髄（イヌのみ）であった。これらの器官で認められた所見は、そのプロファイル（すなわち炎症、変性又は壊死のいずれの所見も伴わない）及び程度から考えてその毒性学的意義は限定的であると考えられ、高い安全域（＞35倍）を有することから目標とする臨床用量においてヒトへの外挿性はないものと考えられた。グラゾプレビルの NOAEL は、rasH2野生型マウスで100 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝164 μM·hr）、CD1マウスで200 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝820 μM·hr）、ラットで200 mg/kg b.i.d.（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝445 μM·hr）及びイヌで15 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝367 μM·hr）であった。これらの投与量は、HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量に対して、rasH2野生型マウスで約37倍、CD1マウスで約185倍、ラットで約100倍及びイヌで約83倍に相当する。グラゾプレビルに遺伝毒性は認められず、出生前及び出生後の発生に関していずれの毒性も認められなかった。

<u>エルバスビル毒性プロファイル</u>

遺伝毒性試験として、ICH S2A、S2B 及び最新の ICH S2 (R1)ガイダンスで推奨されている標準的な組合せである、細菌を用いる復帰突然変異試験、in vitro 染色体異常試験、並びに in vitro 及び in vivo 小核試験を実施した。In vitro 試験の最高用量は、限界量又は最大溶解量とし、in vivo 試験の最大投与量は、限界量（1000 mg/kg）の1日2回投与とした。

独立した単回投与毒性試験は実施していないが、エルバスビルをマウスに最大1000 mg/kg/日ま

Confidential

で、ラットに最大1000 mg/kg b.i.d.まで、及びイヌに最大1000 mg/kg/日まで投与した反復投与毒性試験内で、ICH M3 (R2)ガイダンスに従って単回投与後に急性毒性を評価した。いずれの動物種においても、死亡は認められず、急性毒性を示唆する変化はみられなかった。したがって、概略の致死量は、雌雄マウス及び雌雄イヌで1000 mg/kg/日超、雌雄ラットで1000 mg/kg b.i.d.（1日総投与量2000 mg/kg）超であった。

エルバスビルの毒性プロファイルをラット／イヌの反復投与毒性試験及び rasH2野生型マウスの用量設定試験より評価した。非臨床試験におけるエルバスビルの経口投与調製物について、ポリソルベート80又はビタミン E TPGS を含有する調製物や HPMCAS-LF 又は HPMCP を含有する非晶質分散体調製物など様々な調製物について検討した結果、ポリソルベート80を含有する溶液を用いてエルバスビルを経口投与したときに最大の全身曝露が得られた。したがって、毒性試験では、脱イオン水にポリソルベート80が5%又は10%（w/w）となるように調製した溶液を媒体として用いた。

反復投与毒性試験の高用量の設定は、ICH M3 (R2)ガイダンスに従って、限界量とされる1000 mg/kg/日を一部の例外を除き採用した。ラット／イヌ慢性毒性試験で得られた NOAEL より算出した安全域を[表 2.6.6-3]に示す。

表 2.6.6-3　エルバスビルの全身曝露量に基づいた安全域

	NOAEL mg/kg/day	Toxicokinetic Values at NOAEL		Safety Margins to the Clinical Dose[a]	
		$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ µM·hr	C_{max} µM	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$	C_{max}
Mouse (rasH2 wild-type) (1 month)[b]	1000	151	9.17	54X	52X
Rat (6 months)[c]	1000	21.9	1.54	8X	9X
Dog (9 months)[d]	1000	16.6	1.31	6X	7X

a Calculations based on ratio of daily exposure ($AUC_{0\text{-}24\ h}$) and C_{max} in nonclinical species to the respective daily exposure ($AUC_{0\text{-}24\ hr}$) and C_{max} in Japanese HCV-infected patients at the recommended daily clinical dose of elbasvir, 50 mg, when co-administered with grazoprevir, 100 mg. The $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ and C_{max} in HCV-infected patients are the geometric mean steady state $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ and C_{max} calculated from individual estimates by population PK analysis respectively from clinical protocol MK-5172-P058.
b Study TT#[redacted]-6047 [Sec. 2.6.7.B.6]
c Study TT#[redacted]-6033 [Sec. 2.6.7.B.7D].
d Study TT#[redacted]-6030 [Sec. 2.6.7.B.7G].

マウスでは rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験を実施し、実施する可能性のあった rasH2トランスジェニックマウスの短期がん原性試験で使用する用量について検討した。最高用量である1000 mg/kg/日まで、投薬に関連した変化はみられなかった。1000 mg/kg/日の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝151 µM·hr）は、HCV 感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約54倍に相当する。

Confidential

ラットでは14日間経口投与毒性試験の最高用量を1000 mg/kg b.i.d.（総1日投与量：2000 mg/kg）としたが、3及び6ヵ月間経口投与毒性試験の最高用量は1000 mg/kg/日とした。これは、1000 mg/kg b.i.d.と1000 mg/kg/日との曝露量がほぼ同様であったためである。1000 mg/kg b.i.d.群で糞便の白色化がみられ、未吸収の被験物質が糞便中に排泄されたことが示唆され、エルバスビルの経口バイオアベイラビリティには上限があると考えられた。各試験の低用量及び中用量は、それぞれ、14日間試験では100及び300 mg/kg/日、3ヵ月試験では50及び300 mg/kg/日、6ヵ月試験では30及び300 mg/kg/日とした。1000 mg/kg b.i.d.群でみられた糞便の白色化の他、1000 mg/kg b.i.d.群で好中球及びコレステロールのごく軽度又は軽度の増加が、300 mg/kg/日以上の群で摂餌量の減少に続く体重増加量の減少が、30 mg/kg/日以上の群で流涎及び尿量の増加（尿比重の減少を伴う）がみられた。これらの変化に関して、その程度はごく軽度～軽度であり、すべての試験において一貫して投薬に関連するとは言えず、動物の健康状態に影響を与えるものではなく、剖検時の肉眼所見及び病理組織所見を伴わなかった。したがって、これらの毒性学的意義は低いと考えられた。よって、ラットにおける NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。本用量における全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝21.9 μM·hr）は、HCV 感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約8倍に相当する。

イヌにおいて、14日間経口投与毒性試験では25 mg/kg/日で評価した結果、投薬に関連した変化は認められなかった［$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 16.0 μM·hr、HCV 感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約6倍に相当］。3及び9ヵ月間経口投与毒性試験では、最高用量を限界量の1000 mg/kg/日とした。本用量での $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ は16.6 μM·hr と低値であり、これは糞便の白色化（吸収されずに糞便中に排泄された被験物質に起因するものと考えられる）から示唆されるように、エルバスビルの経口バイオアベイラビリティが低いためと考えられた。各試験の低用量は、3ヵ月試験では2 mg/kg/日及び6ヵ月試験では5 mg/kg/日とし、中用量は両試験とも25 mg/kg/日とした。これらの試験では、糞便の白色／薄茶色化（吸収されずに糞便中に排泄された被験物質に起因するものと考えられた）、嘔吐（散発性）、並びに摂餌量減少（時折）に伴う体重減少（一過性）がみられた。イヌでみられたこれらの所見は、動物の健康状態に影響を与えるものではなく、両試験において一貫して投薬に関連するとは言えず、剖検時の肉眼所見及び病理組織所見を伴わず、1ヵ月間投与後に3ヵ月間の回復期間を設けた試験において投与終了後ただちに回復した。したがって、これらの変化の毒性学的意義は低いと考えられた。病理組織学的検査では、胃、小腸（パイエル板）及び大腸の消化管関連リンパ系組織、リンパ節あるいは胆嚢の孤立リンパ小節における空胞化が25 mg/kg/日以上の群で、並びに脾臓における空胞化が1000 mg/kg/日群でみられた。本変化は、巨大な泡沫細胞がみられることが特徴であり、この細胞は形態学的にリンパ系組織の濾胞領域に存在するマクロファージであった。TEM 検査から、この空胞はマクロファージ内のミエリン像と関連し、ライソソームにリン脂質が蓄積したことによるもの（リン脂質症）であった。リンパ系組織に空胞変化に関連するその他の変化がみられていないこと、特にリンパ様細胞の減少又は炎症／壊死が認められていないこと、血液学的検査で空胞変化に伴う変化が認められていないこと（白血球数又はリンパ球数の減少、循環血球に異常がみられないことなど）などの特徴があった。変化の程度はごく軽度から軽度であり、発生率及びその程度は1ヵ月試験と9か月試験で

Confidential

同等であった。さらに、本変化は、1ヵ月間投与後に3ヵ月間の回復期間を設けた試験において回復性が示された。

イヌの毒性試験でみられたリンパ系組織におけるリン脂質症は、その程度が軽度であったこと、リンパ系組織に毒性がみられていないこと（すなわち、リンパ様細胞の減少、炎症又は壊死が認められていないこと）、又は血液学的検査で投薬に関連した変化が認められていないこと（すなわち、白血球数又はリンパ球数の減少、循環血球に異常がみられないこと）から、毒性学的意義は低いと考えられた。短期試験でみられたリンパ系組織内の空胞化の程度はより長い期間投与した長期試験においてもその程度に増強はみられず、リン脂質症から生じる明らかな機能変化及び病理組織学的変化はみられないことから示されるように、長期曝露を実施しても重要な毒性を示さず、回復性があることが示されていることは重要である。よって、イヌにおける NOAEL は、1000 mg/kg/日以上であった。本用量における全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝16.6 μM·hr）は、HCV 感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約6倍に相当する。

イヌの毒性試験でみられたライソソームのリン脂質蓄積について、その病因は不明である。しかし、エルバスビルは、リン脂質症を誘起することが知られている陽イオン性両親媒性薬物と共通した物理化学的特性を有している。エルバスビルは親水基及び疎水基をそれぞれ1つずつ有し、酸性下で正に荷電していると考えられる[3.2.S.1.2項（エルバスビル）]。標的器官は、消化管及び胆嚢の孤立リンパ小節に関連するリンパ系組織及びリンパ節であり、これらの器官でエルバスビルの濃度が高いことは、エルバスビルの経口投与時の絶対バイオアベイラビリティが低いこと（未吸収の被験物質がみられた）、及びエルバスビルの主要排泄経路が腸又は胆汁排泄であることと一貫している[2.6.4.B.6.3 項]。このようにエルバスビルの濃度が局所的に高いことが、これらの器官に影響を及ぼしている可能性がある。したがって、この局所変化の安全係数は、臨床用量（ヒト体重を60 kg と仮定して mg/kg に換算）に対する用量の倍数として算出した。イヌに最大9ヵ月間投与しても、5 mg/kg/日以下ではこれらの器官にリン脂質症はみられなかった。本用量は、臨床用量、50 mg 又は0.8 mg/kg の6倍である。さらに、最高用量の1000 mg/kg/日群においてのみ、脾臓に軽度なリン脂質症がみられた。脾臓のリン脂質症に関する NOEL は、25 mg/kg/日であり、そのときの全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝5.28 μM·hr）は、HCV 感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約2倍に相当する。

要約すると、イヌの反復投与毒性試験における病理組織学的変化は、リンパ系組織でみられたごく軽度から軽度の可逆的なリン脂質症のみであり、これらの組織に他の影響は認められなかった。ラット又はマウスの反復投与毒性試験において、イヌと同程度又はより高い曝露が見込める投与量を投与しても、リン脂質症はみられなかった。多くの既承認薬で実験動物において、またいくつかの薬ではヒトにおいて、リン脂質症が観察されている。In vivo 又は ex vivo 動物試験でリン脂質症と毒性を関連づける証拠はほとんどなく、ヒトのリン脂質症と臨床毒性を関連付ける証拠もない[資料4.3: 3]。例えば、ロラタジン（季節性及び通年性アレルギー性鼻炎に関連する症状を緩和する既承認の持続性ヒスタミン H1受容体拮抗薬）は、ラット及びサルに可逆的なリン脂質症を誘起した。しかし、ヒトにロラタジン40 mg/kg/日を3ヵ月間投与した試験において、リン脂質症の発現は認められていない[資料4.3: 4]。

Confidential

ICH S1A ガイダンスに従って、ヒトへの投与期間が6ヵ月未満であり、標準的な組合せの遺伝毒性試験でいずれの遺伝毒性も認められず、慢性毒性試験でいずれの増殖性の徴候の証拠も認められなかったことから、がん原性試験は実施しなかった。

生殖発生毒性試験において、性成熟した雌雄ラットに50、300及び1000 mg/kg/日を投与して、雌雄の受胎能を評価した。1000 mg/kg/日群の雄で、精巣上体尾部1 g 当たりの精子数の減少（対照群と比較して14%減少）が認められた。生殖成績、受胎能、胚／胎児生存率、精巣重量平均値及び精子の運動性などのいずれの生殖パラメータに投与に関連した影響はみられず、ラット及びイヌの反復投与毒性試験において病理組織学的な精巣変化もみられなかったことから、本精子数の減少の毒性学的意義は低く、可逆的と考えられたため、雌雄の受胎能に関する NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。本用量の $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ は17.3 μM·hr（ラットの3ヵ月間毒性試験の投与13週から引用）であり、これは HCV 感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約6倍に相当する。器官形成期の妊娠ラット又は妊娠ウサギに、エルバスビルを限界量の1000 mg/kg/日［$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ はそれぞれ21.8及び39.4 μM·hr、HCV 感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量のそれぞれ約8及び14倍に相当］まで投与しても、催奇形性はみられなかった。器官形成期及び授乳期の妊娠ラットにエルバスビルを限界量の1000 mg/kg/日まで投与しても、ラット F_1 世代に投薬に関連した変化はみられなかった。本用量での $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ は21.8 μM·hr（ラットの胚・胎児発生に関する試験における TK 結果から引用）であり、HCV 感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約8倍に相当する。ラットの母動物では、1000 mg/kg/日群で体重増加量及び摂餌量の減少がみられた。これらの変化は軽度であり、すべての生殖発生毒性試験で一貫してみられたわけではなかった。したがって、母動物の NOAEL はラット及びウサギにおいて1000 mg/kg/日以上であり、ウサギでは NOAEL が NOEL でもあった。

エルバスビルは波長領域290～700 nm の光の吸収を示すことから[3.2.S.3.1項（エルバスビル）]、有色ラットの光毒性試験（投与量：100 mg/kg/日及び1000 mg/kg/日）を実施した。本試験において眼及び皮膚に投薬に関連した所見はみられなかったことから、エルバスビルに光毒性の懸念はないことが示唆された。

その他、重要な試験以外の試験として、眼及び皮膚刺激性試験、局所リンパ節試験及び溶血性試験を実施した。いずれの試験においても、重要な毒性学的所見はみられなかった。エルバスビルは、眼及び皮膚刺激性試験において無刺激性と分類され、マウス局所リンパ節試験において皮膚感作性はないことが示された。ADME に関する臨床試験（静脈内投与）を裏付けるために実施した溶血試験において、エルバスビルの静脈内投与用調製物は、ヒト赤血球に溶血を引き起こさなかった。

要約すると、エルバスビルの一般毒性プロファイル、特定の標的器官毒性、遺伝毒性及び生殖発生毒性を一連の in vivo 及び in vitro 試験により評価した結果、エルバスビルの毒性学的プロファイルを十分に特徴づけることができた。全体として、エルバスビルは反復投与に対して忍容性が高く、唯一認められた顕著な病理組織学的変化は、イヌでのみリンパ組織で主にみられたごく軽度から軽度の可逆的なリン脂質症であった。本所見は、その程度が軽度であったこと、リンパ系組織に毒性がみられていないこと、血液学的検査で投薬に関連した変化が認められていないこ

Confidential

とから、毒性学的意義は低いと考えられた。エルバスビルをラット及びイヌに反復投与（それぞれ6及び9ヵ月間）並びにrasH2野生型マウスに1ヵ月間投与したときのNOAELは、1000 mg/kg/日以上であった。これらの投与量は、HCV感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量と比較して、ラットで約8倍、イヌで約6倍及びrasH2野生型マウスで約54倍に相当する。エルバスビルに遺伝毒性又は光毒性は認められず、出生前及び出生後の発生に関していずれの毒性も認められなかった。

グラゾプレビル／エルバスビル併用時の毒性プロファイル

グラゾプレビル及びエルバスビルをそれぞれ単独投与したときの非臨床安全性試験の結果より、重複する毒性所見又はグラゾプレビル／エルバスビル併用に関して懸念すべき事項は特に認められなかった。イヌの1ヵ月間グラゾプレビル／エルバスビル併用毒性試験を実施し、グラゾプレビル／エルバスビルを5/25 mg/kg/日で併用投与したところ、相加的又は相乗的な毒性の増強、又は、TK的相互作用はみられなかった。本用量でのイヌにおける全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝60.2/7.76 μM·hr）は、HCV感染患者にグラゾプレビル／エルバスビルを併用投与したときの全身曝露量の約14/3倍に相当する。

全体として、毒性プロファイルは、慢性HCV感染に対する治療法としてグラゾプレビル（100 mg）とエルバスビル（50 mg）併用療法の安全性を裏付けるものであった。

Confidential

2.6.6.A　A 項：グラゾプレビル

2.6.6.A.2　単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施していないが、マウスに最大500 mg/kg/日まで、ラットに最大1000 mg/kg/日まで［全身曝露量の最高値は200 mg/kg b.i.d.（400 mg/kg/日）投与時］及びイヌに最大600 mg/kg/日まで投与した反復投与毒性試験内で、ICH M3 (R2)ガイダンスに従って急性毒性を評価した。いずれの動物種においても、急性毒性を示唆する変化はみられなかった[2.6.6.A.3 項]。

rasH2野生型マウス及び CD1マウスでは、最大500 mg/kg/日までの初回投与後、死亡は認められず、急性毒性を示唆する変化はみられなかったことから、概略の致死量は500 mg/kg 超であった[2.6.6.A.3.1 項]、[2.6.6.A.3.2 項]。ラットでは最大1000 mg/kg/日まで［全身曝露量の最高値は200 mg/kg b.i.d.（400 mg/kg/日）投与時］の初回投与後、死亡は認められず、急性毒性を示唆する変化はみられなかったことから、概略の致死量は1000 mg/kg 超であった[2.6.6.A.3.4 項]、[2.6.6.A.3.6 項]。イヌでは最大600 mg/kg/日までの初回投与後、死亡は認められず、認められた所見は300 mg/kg 以上での嘔吐に限定されており、概略の致死量は600 mg/kg 超であった[2.6.6.A.3.8 項]、[2.6.6.A.3.9 項]。

2.6.6.A.2.1　雄性 CD1マウスの単回経口投与トキシコキネティクス探索試験（TT#[redacted]-6043）

[資料4.2.3.1.1: TT#[redacted]-6043]

本試験の目的は、雄性 CD1マウスにグラゾプレビルを単回経口投与したときの TK プロファイルを検討し、これに続くマウス試験の用量を設定することであった（TT#[redacted]-6043）[2.6.7.A.5 項]。

Crl:CD1(ICR)マウスを11匹ずつ2群に割り付けし、グラゾプレビルの噴霧乾燥調製物を150又は350 mg/kg の投与量で単回経口投与した。投与物は、50%（w/w）のグラゾプレビル遊離酸及び50%（w/w）の HPMCP を含有する噴霧乾燥調製物を、0.5%（w/v）メチルセルロース／0.02%（w/v）ラウリル硫酸ナトリウム水溶液（5 mM 塩酸含有）に懸濁させて調製した。

一般状態観察は生死の確認のみとし、体重は投与量算出のみを目的として測定した。両用量について血漿中グラゾプレビル濃度を測定した。すべての動物について、剖検を実施せずに安楽殺処分した。

試験期間中に死亡はみられなかった。

グラゾプレビルの TK パラメータを[表 2.6.6.A-1]に示す。

表 2.6.6.A-1　雄性マウスにグラゾプレビルを単回経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 1 日）

Dose (mg/kg)	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
150	953 ± 198	94.4 ± 10.9	4.0 ± NC
350	1420 ± 220	95.1 ± 7.65	4.0 ± NC

NC = Not Calculated
[Sec. 2.6.7.A.5] Exploratory Single-Dose Oral Toxicokinetic Study in Male CD1 Mice.　TT#[redacted]-6043

Confidential

150及び350 mg/kg で投与した際の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）の比は用量比を下回り、C_{max} は両用量で類似していた。

2.6.6.A.3　反復投与毒性試験

マウスで最大3ヵ月間（経口投与用量設定試験）、ラットで最大6ヵ月間及びイヌで最大9ヵ月間の反復投与毒性試験を実施し、グラゾプレビルの毒性を検討した。マウスの用量設定試験は、実施する予定であったがん原性試験で使用する投与量を検討するために実施した。最初に実施したラットの1ヵ月間経口投与毒性試験において、全身曝露量は予想外に低かった。その後、グラゾプレビルの全身曝露量は、懸濁液投与時よりも溶液投与時のほうが高いことが判明したため、ラット1ヵ月間毒性試験を溶液での投与可能な最高用量である200 mg/kg の1日2回投与を最高用量に設定して再度実施した。特に明記しない限り、通常、生前検査パラメータ（一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査及び臨床病理検査、イヌのみ心電図検査を含む）及び病理検査パラメータ（全身の種々の組織についての臓器重量、肉眼検査、病理組織学的検査）について評価した。マウスの用量設定試験、並びにラット及びイヌの重要な試験についての概要を[表 2.6.6.A-2]に示す。

表 2.6.6.A-2　グラゾプレビルのマウス、ラット及びイヌにおける反復経口投与毒性試験

Study	Species/Sex	Duration of Treatment	Doses Evaluated (mg/kg/day)	Formulation
TT#[redacted]-6034	Mouse[a]/F&M	1 month	0, 20, 100, 200, 500[b]	SDF[c]
TT#[redacted]-6038	Mouse[d]/F&M	3 months	0, 20, 100, 200, 500[b]	SDF[c]
TT#[redacted]-2525	Rat/F	7 days	0, 20, 40, 200	100% PEG 400
TT#[redacted]-1152	Rat/F&M	1 month	0, 25, 50, 1000	100% PEG 400
TT#[redacted]-1120	Rat/F&M	1 month with a 2-week interim necropsy	0, 50, 200, 200 b.i.d.[e]	100% PEG 400
TT#[redacted]-6014	Rat/F&M	6 months	0, 50, 200, 200 b.i.d.[e]	100% PEG 400
TT#[redacted]-1151	Dog/F&M	1 month	0, 5, 20, 600[f]	100% PEG 400
TT#[redacted]-6015	Dog/F&M	9 months with a 3-month interim necropsy	0, 5, 15, 300/100[g]	100% PEG 400

a　rasH2 wild-type Mouse.
b　High dose expected to result in systemic plasma exposure that is high multiple (>50-fold) over human exposure.
c　The routine volume of administration of 100% PEG 400 formulations, 2 mL/kg is not appropriate for mouse dosing; therefore, an alternative formulation (spray-dried formulation containing 50% (w/w) of grazoprevir (free acid) and 50% (w/w) of hydroxypropylmethylcellulose-phtalate) was developed for the mouse studies.
d　CD1 Mice.
e　High dose expected to result in highest achievable systemic plasma exposure.
f　The high dose was expected to produce toxicity based on results from the preliminary tolerability study and to result in systemic plasma exposure that is high multiples (>50-fold) the human exposure.
g　High dose was lowered to 100 mg/kg/day from Study Day 79 (Study Week 12).
F = Female.
M = Male.
PEG = Polyethylene glycol.
SDF = Spray-dried formulation containing 50% (w/w) of grazoprevir (free acid) and 50% (w/w) of hydroxypropylmethylcellulose-phtalate in 0.5% (w/v) methylcellulose/0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water.

[2.6.7.A.7A 項]、[2.6.7.A.7B 項]、[2.6.7.A.6 項]、[2.6.7.A.7C 項]、[2.6.7.A.7D 項]、[2.6.7.A.7E 項]、[2.6.7.A.7F 項]、[2.6.7.A.7G 項]

Confidential

2.6.6.A.3.1　rasH2野生型マウス（交雑系）の1ヵ月間経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-6034）

[資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034]

本試験の目的は、グラゾプレビルを rasH2野生型マウスに約1ヵ月間1日1回経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを評価し、実施する予定であったマウスの短期がん原性試験で使用する投与量を検討することであった（TT#[redacted]-6034）[2.6.7.A.7A 項]。

Jic:CB6F1-nonTgrasH2@Jcl マウスを、毒性評価群として5群（各群雌雄各10匹）、及び TK 測定のため対照群として1群（雌雄各5匹）、被験物質を投与する4群（各群雌雄各11匹）に割り付けた。投与物は、50%（w/w）のグラゾプレビル遊離酸及び50%（w/w）の HPMCP を含有する噴霧乾燥調製物を、0.5%（w/v）メチルセルロース／0.02%（w/v）ラウリル硫酸ナトリウム水溶液（5 mM 塩酸含有）に懸濁させて調製し、各投与群に20、100、200又は500 mg/kg/日の投与量で経口投与した。対照群には、最高用量群と同量の HPMCP を含有する媒体を投与した。

通常の評価項目に加え、肝臓標本に対して TEM 検査を実施し、肝臓－胆嚢ホモジネート中のグラゾプレビル濃度を測定した。

投与期間中、投薬に関連した変化が雌雄とも100 mg/kg/日以上の群でみられた。500 mg/kg/日群で、雌雄で体重の減少がみられ、また対照群と比較して、雌で総白血球数（-37%）及びリンパ球数（-43%）の減少、雄で総白血球数（+63%）、好中球数（+53%）、リンパ球数（+61%）及び好酸球数（+350%）の増加、雌雄で軽度の赤血球の増加及び他の赤血球パラメータ（平均赤血球容積、ヘモグロビン及びヘモグロビン濃度）の減少、血小板数の軽度の増加がみられた。血清生化学的検査では、対照群と比較して、雌雄で総／直接ビリルビン（最高47倍）、AST（最高2倍）、ALT（最高5倍）及び ALP（2倍未満）の増加、血清総蛋白、アルブミン及びグロブリンの軽度の減少、グルコース、リン及びコレステロールの軽度の増加、雄1例で血液尿素窒素の軽度の増加がみられた。200 mg/kg/日群で、対照群と比較して、雌で総白血球数及びリンパ球数の減少（両パラメータとも-41%）、雄で血小板数の軽度の増加がみられた。血清生化学的検査では、雌雄で総／直接ビリルビンの増加（最高8倍）、雌で ALT（2倍未満）、ALP（個体別）及びリンの軽度の増加、並びに血清総蛋白、アルブミン及びグロブリンの軽度の減少、雌雄でコレステロールの軽度の増加がみられた。100 mg/kg/日群で、雌で総白血球数及びリンパ球数の軽度の減少、雌雄でコレステロールの軽度の増加、雄1例で総ビリルビンの軽度の増加がみられた。

剖検・病理組織学的検査では、雌で100 mg/kg/日以上の群で、雄で200 mg/kg/日以上の群で投薬に関連した変化がみられた。500 mg/kg/日群で、腎尿細管上皮の変性（雌：ごく軽度、雄：ごく軽度～中等度）、肝細胞サイズの増大（ごく軽度～軽度、雌雄）、門脈周囲部における肝細胞細胞質の淡明化［軽度、肝細胞におけるグリコーゲン量の増加（PAS 染色及び TEM により確認）と一致、雌］、小腸（多くが十二指腸に限局）における絨毛の萎縮（雌：ごく軽度、雄：ごく軽度～軽度）がみられた。本群における肝細胞サイズの増大は、雌雄で認められた肝重量の増加及び肝臓サイズの増大と関連しており、雄では小葉構造の明瞭化もみられた。100 mg/kg/日以上の群の雌及び200 mg/kg/日以上の群の雄で、肝重量平均値の増加がみられた。200 mg/kg/日群の雄で肝細胞サイズの増大（ごく軽度～軽度）も認められたが、500 mg/kg/日群と比較して全体的にその程

Confidential

度及び発現頻度は低下していた。500 mg/kg/日群の雌雄及び200 mg/kg/日群の雄2例で前述以外の組織にも病理組織学的変化がみられたが、これらは動物の一般状態の悪化に起因した二次的変化と考えられた。

投与4週におけるグラゾプレビルの TK パラメータ及び肝臓－胆嚢ホモジネート中濃度測定の結果を[表 2.6.6.A-3]及び[表 2.6.6.A-4]に示す。

表 2.6.6.A-3　マウスにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 4 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
20	Female	5.34 ± 0.472	2.16 ± 0.572	0.50 ± NC
	Male	4.66 ± 0.510	1.97 ± 0.278	1.0 ± NC
	All	5.00 ± 0.334	1.91 ± 0.265	1.0 ± NC
100	Female	190 ± 89.0	36.2 ± 10.1	1.0 ± NC
	Male	138 ± 22.5	45.4 ± 6.54	1.0 ± NC
	All	164 ± 41.9	40.8 ± 5.74	1.0 ± NC
200	Female	335 ± 82.2	61.5 ± 9.04	1.0 ± NC
	Male	332 ± 61.8	83.0 ± 11.0	2.0 ± NC
	All	333 ± 49.5	63.7 ± 10.1	2.0 ± NC
500	Female	2140 ± 375	234 ± 72.9	0.50 ± NC
	Male	3470 ± 1140	290 ± 43.3	2.0 ± NC
	All	2810 ± 574	242 ± 31.1	2.0 ± NC

NC = Not Calculated
[Sec. 2.6.7.A.7A]　One-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in rasH2 Wild-Type Mice (Hybrid).　TT#[redacted]-6034

表 2.6.6.A-4　マウスにグラゾプレビルを経口投与後の肝臓－胆嚢中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）（投与 4 週）

Dose (mg/kg/day)	Time (hr) 4	8	24
20	123 ± 6.30	75.1 ± 9.20	3.31 ± 0.904
100	274 ± 29.0	294 ± 52.7	51.3 ± 20.4
200	340 ± 30.2	361 ± 24.6	169 ± 25.8
500	680 ± 57.2	444 ± 85.5	490 ± 47.0

[a] Assuming liver-gallbladder density of 1.0 g/mL.
[Sec. 2.6.7.A.7A]　One-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in rasH2 Wild-Type Mice (Hybrid).　TT#[redacted]-6034

血漿中濃度は全投与群で個体間でのばらつきが大きかった。全投与群において、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値に性差（雌雄間で2倍以上の差）はみられなかった。

全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、20～100 mg/kg/日の用量範囲では用量比を上回り、100～200 mg/kg/日の用量範囲ではほぼ用量に比例し、200～500 mg/kg/日の用量範囲では用量比を上回った。

全投与群において、肝臓及び胆嚢にグラゾプレビルの曝露がみられた。概して、投与から4、8及び24時間後の肝臓－胆嚢中グラゾプレビル濃度平均値に性差はみられず、濃度の平均値は用量に比例して上昇した。

Confidential

以上の結果から、本試験における NOEL は雌雄ともに20 mg/kg/日であった。しかし、100 mg/kg/日で認められた変化は、ごく軽度～軽度の血液学的／血清生化学的変化及び肝重量の増加のみであり、それらの程度は低く、いずれも動物の一般状態に影響を与えず、関連する病理組織学的変化を伴わないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。よって、本試験における NOAEL は 100 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝164 ± 41.9 μM·hr）であった。

2.6.6.A.3.2　CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-6038）

[資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038]

本試験の目的は、グラゾプレビルを CD1マウスに約3ヵ月間1日1回経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを評価し、実施する予定であったマウスの長期がん原性試験の用量を設定することであった（TT#[redacted]-6038）[2.6.7.A.7B 項]。

Crl:CD1(ICR)マウスを、用量設定群として5群（各群雌雄各10匹）、TK 測定のため対照群として1群（雌雄各5匹）、被験物質を投与する4群（各群雌雄各11匹）に割り付けた。投与物は、50%（w/w）のグラゾプレビル遊離酸及び50%（w/w）の HPMCP を含有する噴霧乾燥調製物を、0.5%（w/v）メチルセルロース／0.02%（w/v）ラウリル硫酸ナトリウム水溶液（5 mM 塩酸含有）に懸濁させて調製し、各投与群に20、100、200又は500 mg/kg/日の投与量で経口投与した。対照群には、最高用量群と同量の HPMCP を含有する媒体を投与した。

通常の評価項目に加え、肝臓標本に対して TEM 検査を実施し、肝臓－胆嚢ホモジネート中のグラゾプレビル濃度を測定した。

投薬に関連した死亡が、投与15日に用量設定群の500 mg/kg/日群の雄1例でみられた。

投与期間中、雌で200 mg/kg/日以上の群、雄で100 mg/kg/日以上の群に投薬に関連した変化がみられた。500 mg/kg/日群で、雌雄で赤血球数及び他の赤血球パラメータ（ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット、平均赤血球容積、ヘモグロビン）の軽度の減少、血清グルコース、ALT 及び ALP の軽度な増加（ALT 及び ALP は対照群と比較して2倍未満）、総／直接ビリルビンの中等度～重度の増加（対照群と比較して最高32倍）がみられた。さらに、雌で好中球及びリンパ球数の増加による白血球数の軽度の増加、血清コレステロールの軽度の増加、雄で総体重増加量の低下がみられた。200 mg/kg/日群で、対照群と比較して、雌雄で血清 ALP（2倍未満）及び総ビリルビン（最高3倍）の軽度の増加、雌で血清 ALT（2倍未満）の増加、雄で血清グルコースの増加がみられた。100 mg/kg/日群で、対照群と比較して、雄で血清総／直接ビリルビンの軽度の増加（最高2倍）がみられた。

剖検・病理組織学的検査では、雌雄とも200 mg/kg/日以上の群で投薬に関連した変化がみられた。500 mg/kg/日群で、雌雄でごく軽度～重度の腎尿細管上皮の変性及びごく軽度～中等度の肝細胞サイズの増大（雌雄での肝重量平均値の増加あるいは肝臓サイズの増大及び雄では小葉構造の明瞭化を伴う）がみられた。肝細胞サイズの増大は、雌では門脈周囲部における肝細胞細胞質のごく軽度～軽度の淡明化を伴っていた。500 mg/kg/日群の雌雄各2例の肝臓について、TEM 検査を実施したところ、門脈周囲部及び小葉中心部の肝細胞細胞質には多量にグリコーゲンが蓄積しており、雌でより顕著であった。胆嚢では限局性のごく軽度～軽度の炎症が雌雄各1例で認められ

Confidential

た。200 mg/kg/日群では、雌雄の肝重量の増加に関連し、雌1例で門脈周囲部における肝細胞細胞質のごく軽度の淡明化を伴うごく軽度～軽度の肝細胞サイズの増大がみられた。500 mg/kg/日群の投与期間中に死亡した動物及び同群の予定された剖検日にまで生存した動物でみられた他の病理組織学的変化は、動物の一般状態の悪化に起因した二次的変化と考えられ、被験物質に直接関係がないものと考えられた。

投与13週におけるグラゾプレビルの TK パラメータ及び肝臓／肝臓－胆嚢ホモジネート中濃度を[表 2.6.6.A-5]及び[表 2.6.6.A-6]に示す。

表 2.6.6.A-5　マウスにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 13 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
20	Female	9.02 ± 2.70	1.56 ± 0.647	0.50 ± NC
	Male	6.91 ± 1.67	1.47 ± 0.743	0.50 ± NC
	All	7.96 ± 1.54	1.52 ± 0.441	0.50 ± NC
100	Female	448 ± 116	51.6 ± 8.42	0.50 ± NC
	Male	455 ± 146	38.5 ± 12.3	1.0 ± NC
	All	451 ± 83.5	39.4 ± 8.13	1.0 ± NC
200	Female	957 ± 141	67.4 ± 13.8	8.0 ± NC
	Male	683 ± 165	50.9 ± 7.29	1.0 ± NC
	All	820 ± 109	56.3 ± 10.8	8.0 ± NC
500	Female	1550 ± 161	150 ± 41.8	2.0 ± NC
	Male	1390 ± 286	108 ± 26.7	2.0 ± NC
	All	1470 ± 173	129 ± 24.1	2.0 ± NC

NC = Not Calculated
[Sec. 2.6.7.A.7B]　Three-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in CD1 Mice.
TT#[redacted]-6038

表 2.6.6.A-6　マウスにグラゾプレビルを経口投与後の肝臓－胆嚢中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）（投与 13 週）

Dose (mg/kg/day)	Time (hr) 4	8	24
20[b]	168 ± 14.7	93.6 ± 17.3	2.38 ± 0.828
100[b]	316 ± 34.3	389 ± 33.1	46.9 ± 22.7
200	453 ± 19.1	442 ± 30.8	67.2 ± 15.6
500	477 ± 32.6	482 ± 43.3	187 ± 29.5

[a] Assuming liver or liver-gallbladder density of 1.0 g/mL.
[b] At the 4-hour timepoint, only liver tissue was collected.
[Sec. 2.6.7.A.7B]　Three-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in CD1 Mice.
TT#[redacted]-6038

血漿中濃度は全投与群で個体間のばらつきが大きかった。全投与群において、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値に性差はみられなかった。全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、20～100 mg/kg/日の用量範囲では用量比を上回り、100～500 mg/kg/日の用量範囲ではほぼ用量に比例した。

全投与群において、肝臓又は肝臓－胆嚢にグラゾプレビルの曝露がみられ、個体間で大きなば

Confidential

らつきがみられた。概して、投与から4、8及び24時間後の肝臓中又は肝臓－胆嚢中グラゾプレビル濃度平均値に性差はみられなかった。

rasH2野生型マウス（TT#[redacted]-6034）[2.6.7.A.7A 項]と CD1マウス間の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値及び C_{max} 平均値の差については完全に解明されてはいないが、各系統において個体間でのばらつきが大きかったことが一因である可能性が考えられた。

個体間におけるばらつきを考慮すると、肝臓－胆嚢中グラゾプレビル濃度平均値は、両系統において同程度と考えられる。

以上の結果から、本試験における NOEL は雌で100 mg/kg/日、雄で20 mg/kg/日であった。しかし、200 mg/kg/日以下の群で投与期間中に認められた所見はごく軽度～軽度の血清生化学的検査値の変化であり、関連する病理組織学的変化を伴わないことから、これらの毒性学的意義は低いと考えられた。

200 mg/kg/日群でみられた剖検・病理組織学的検査所見は、肝重量の増加に関連した門脈周囲部における肝細胞細胞質のごく軽度の淡明化（雌1例）を伴うごく軽度～軽度の肝細胞サイズの増大であり、これらの程度や壊死あるいは炎症がみられていないことから、これら所見の毒性学的意義は低いと考えられた。よって、本試験における NOAEL は200 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝820 ± 109 μM·hr）であった。

2.6.6.A.3.3　雌性ラットの7日間経口投与忍容性試験（TT#[redacted]-2525）

[資料4.2.3.2.3:TT#[redacted]-2525]

本試験の目的は、グラゾプレビルを雌ラットに7日間1日1回経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを評価し、以降に続くラットの反復毒性試験で使用する投与量について検討することであった（TT#[redacted]-2525）[2.6.7.A.6 項]。

Crl:WI（Han)ラット（各群雌5匹）に、グラゾプレビル（カリウム塩）の0（対照群）、20、40又は200 mg/kg/日を経口投与した。被験物質は媒体である100% PEG 400に溶解し、対照群には媒体のみを投与した。

毒性評価は、死亡、一般状態、体重、臨床病理検査（血清生化学的検査）及び評価組織を限定した剖検・病理組織学的検査（肝臓重量、並びに限定した評価対象組織の肉眼及び病理組織学的検査を含む）に基づいて実施した。血漿中及び肝臓中の薬物濃度分析も実施した。

投薬に関連した死亡、一般状態、体重又は肝臓重量の変化、肉眼又は病理組織学的変化はみられなかった。

血清生化学的検査において、投与8日に40及び200 mg/kg/日群でトリグリセリドのごく軽度な増加がみられたが、その程度が小さいことから毒性学的意義は低いと考えられた。

TK パラメータを[表 2.6.6.A-7]に示す。

Confidential

表 2.6.6.A-7　雌性ラットにおける血漿中及び肝臓中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準偏差）

	Grazoprevir (mg/kg/day)		
	Females		
	20	40	200
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	14.6 ± 5.9	117.6 ± 66.8	634.8 ± 579.5*
C_{max} (μM)	4.1 ± 2.6	14.8 ± 5.3	127.7 ± 111.8*
T_{max} (hr)	2.4 ± 1.7	3.2 ± 1.1	2.6 ± 1.3
Liver (μM)	27.9 ± 24.0	64.5 ± 40.4	36.3 ± 24.5

* Standard deviation primarily driven by one animal with a $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ of 1631 μM·hr and C_{max} of 319 μM, other $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ ranging from 204 to 560 μM·hr and C_{max} of 44 to 121 μM.
Data presented as the mean ± standard deviation, n=5.

[Sec. 2.6.7.A.6]　Exploratory 7-Day Oral Tolerability Study in Female Rats.　TT#[redacted]-2525

血漿中濃度は全投与群で個体間のばらつきが大きく、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）は、20 mg/kg/日群で6～22 μM·hr、40 mg/kg/日群で37～213 μM·hr 及び200 mg/kg/日群で204～1631 μM•hr であった。個体間におけるばらつきを考慮すると、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、20～40 mg/kg/日の用量範囲では用量比を上回り、40～200 mg/kg/日の用量範囲ではほぼ用量に比例した。

以上の結果から、NOAEL は200 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 634.8 ± 579.5 μM·hr）以上であった。

2.6.6.A.3.4　ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験［機能観察総合評価（FOB）を含む］（TT#[redacted]-1152）

[資料4.2.3.2.4: TT#[redacted]-1152]

本試験の目的は、グラゾプレビルをラットに約1ヵ月間1日1回経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを評価すること、並びにグラゾプレビルの初回経口投与後の雄ラットへの神経系への影響を評価することであった（TT#[redacted]-1152）[2.6.7.A.7C 項]。

Crl:WI（Han)ラット（各群雌雄各10匹）に、グラゾプレビル（カリウム塩）の0（対照群）、25、50又は1000 mg/kg/日を経口投与した。被験物質は媒体である100% PEG 400に溶解し、対照群には媒体のみを投与した。最高用量は、ICH M3 (R2)ガイダンスに従って限界量とした。

通常の評価項目に加えて、神経系への影響を評価するため、雄ラットで初回投与後に機能観察総合評価を実施した。

投与期間中の投薬に関連した唯一の変化は、全用量での投与直後の流涎（散発的、一過性）であった。本所見はその程度が小さく一過性であるため、本化合物が中枢を介して及ぼした影響ではなく、嗜好上の理由によるものと考えられ、毒性学的意義は低いと考えられた。

剖検・病理組織学的検査で、投薬に関連した変化はみられなかった。

FOB で、投薬に関連した変化はみられなかった。

TK パラメータを[表 2.6.6.A-8]に示す。

Confidential

表 2.6.6.A-8　ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 5 週）

Dose (mg/kg/day)[a]	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
25	Female	7.44 ± 2.62	2.93 ± 1.68	2.0 ± NC
	Male	10.1 ± 2.84	5.24 ± 1.87	2.0 ± NC
	All	8.76 ± 1.92	4.08 ± 1.24	2.0 ± NC
50	Female	29.6 ± 8.84	10.6 ± 3.79	1.0 ± NC
	Male	16.5 ± 6.40	8.13 ± 4.08	2.0 ± NC
	All	23.0 ± 5.66	8.97 ± 2.90	2.0 ± NC
1000	Female	26.4 ± 5.68	8.11 ± 2.49	2.0 ± NC
	Male	22.2 ± 6.86	7.03 ± 3.66	2.0 ± NC
	All	24.3 ± 4.09	7.57 ± 2.06	2.0 ± NC

NC = Not Calculated
[a] No drug levels above the lower limit of quantitation in control plasma samples at 2 hours postdose.
[Sec. 2.6.7.A.7C] One-Month Oral Toxicity Study in Rats With a Functional Observational Battery (FOB).　TT#[redacted]-1152

全投与群において、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値に性差（雌雄間で2倍以上の差）はみられなかった。全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値は、25～50 mg/kg/日の用量範囲では増加率が用量比を上回り、50～1000 mg/kg/日の用量範囲ではほぼ類似していた。これにより、50 mg/kg/日以上の群においては、吸収が飽和していることが示唆された。対照群の投与2時間後の血漿中グラゾプレビル濃度は、生体試料中薬物濃度分析にて定量下限（LLQ）未満であった。

以上の結果から、NOEL は25 mg/kg/日未満であった。投薬に関連した変化は流涎のみであり、本所見の毒性学的意義は低いと考えられたことから、NOAEL は1000 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝24.3 ± 4.09 μM·hr）以上であった。

Confidential

2.6.6.A.3.5　ラットの単回及び反復経口投与トキシコキネティクス試験（TT#[redacted]-1102）

[資料4.2.3.2.5: TT#[redacted]-1102]

本試験の目的は、前述のラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（FOB を含む）で50及び1000 mg/kg/日投与時に認められた低曝露に関して探索することであった（TT#[redacted]-1102）[2.6.7.A.6 項]。

Crl:WI（Han)ラット（27匹）にグラゾプレビル（カリウム塩）の0（対照群）、50、300又は1000 mg/kg/日を経口投与した。媒体は100% PEG 400とし、対照群には媒体のみを投与した[表 2.6.6.A-9]。

表 2.6.6.A-9　ラットにおける試験デザイン

	Females
Grazoprevir	
Group 1: 50 mg/kg[a]	3
Group 2: 1000 mg/kg[a]	3
Group 3: 50 mg/kg[b]	3
Group 4: 1000 mg/kg[b]	6
Group 5: 50 mg/kg/day[c]	6
Group 6: 1000 mg/kg/day[c,d]	6

a　Similar formulation preparation as in the previous 1-month oral toxicity study in rats: 50-mg/kg formulation was prepared by dilution of the 1000-mg/kg formulation.
b　Stand alone formulations (each formulation was prepared individually).
c　Stand alone formulations (each formulation was prepared individually) protected from light.
d　On Study Day 11, dose was changed to 300 mg/kg/day.
Groups 1-4 received a single dose on Study Day 1 and were sacrificed on Study Day 2.
Groups 5 and 6 received daily doses from Study Day 1 to 14. The first 3 animals in Groups 5 and 6 were sacrificed on Study Day 2, and the last 3 animals in Groups 5 and 6 were sacrificed on Study Day 15.

[Sec. 2.6.7.A.6]　Exploratory Single and Multiple Dose Oral Toxicokinetic Study in Rats.　TT#[redacted]-1102

毒性評価は生死の確認により実施した。血漿中薬物濃度は、ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（FOB を含む）（TT#[redacted]-1152）[2.6.7.A.7C 項]において血漿中薬物濃度を測定した Biochemical Toxicology & Analytical Chemistry 研究室（BTAC）（第1～6群）及び雌性ラットの7日間経口投与忍容性試験（TT#[redacted]-2525）[2.6.7.A.6 項]において血漿中薬物濃度を測定した Drug Metabolism & Pharmacokinetic 研究所（DMPK）（第4群の3例）で、肝臓中薬物濃度は BTAC（第5及び6群の投与約24時間後）で測定した。

投薬に関連した死亡はみられなかった。

グラゾプレビルの血漿中濃度における TK パラメータ及び肝臓中濃度を[表 2.6.6.A-10]、[表 2.6.6.A-11]、[表 2.6.6.A-12]、[表 2.6.6.A-13]、[表 2.6.6.A-14]、[表 2.6.6.A-15]及び[表 2.6.6.A-16]に示す。

Confidential

血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ平均値*

表 2.6.6.A-10 ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 1 日）

Dose	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
50 (mg/kg/day)[a]	101 ± 11.1	13.8 ± 1.60	3.0 ± 0.45
50 (mg/kg)[b]	181 ± 64.5	27.8 ± 8.62	2.0 ± 0.0
50 (mg/kg)[c]	69.8 ± 5.46	19.3 ± 0.578	1.7 ± 0.33
1000 (mg/kg/day)[a]	36.5 ± 9.05	7.08 ± 1.88	1.7 ± 0.49
1000 (mg/kg)[b]	21.0 ± 5.81	2.25 ± 1.13	4.7 ± 1.8
1000 (mg/kg)[c]	34.3 ± 10.7	8.08 ± 3.06	2.2 ± 0.60

[a] Stand alone formulations and samples protected from light (Dose Group 5 or 6).
[b] Formulation preparation with dilution (Dose Group 1 or 2).
[c] Stand alone formulations (Dose Group 3 or 4).
* BTAC analysis
[Sec. 2.6.7.A.6]　Exploratory Single and Multiple Dose Oral Toxicokinetic Study in Rats.　TT#[redacted]-1102

表 2.6.6.A-11 ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 14 日）

Dose (mg/kg/day)	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
50[a]	70.0 ± 32.8	11.4 ± 5.37	3.3 ± 0.67
300[a,b]	140 ± 56.6	24.4 ± 6.24	1.0 ± 0.0

[a] Stand alone formulations and samples protected from light.
[b] Animals received 1000 mg/kg/day until Study Day 10 and 300 mg/kg/day onwards.
[Sec. 2.6.7.A.6]　Exploratory Single and Multiple Dose Oral Toxicokinetic Study in Rats.
TT#[redacted]-1102

血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ平均値**

表 2.6.6.A-12 ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 1 日）

Dose (mg/kg/day)	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
1000[a]	14.3 ± 8.5	2.6 ± 2.0	2.3 ± 1.5

[a] Stand alone formulation (Dose Group 4)
** DMPK analysis
[Sec. 2.6.7.A.6]　Exploratory Single and Multiple Dose Oral Toxicokinetic Study in Rats.　TT#[redacted]-1102

Confidential

肝臓中薬物濃度

表 2.6.6.A-13 ラットにグラゾプレビルの 50 mg/kg/日 [b] を経口投与後の肝臓中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（個体別値）（投与 2 日）

Time	Animal			Summary	
	09-0031	09-0033	09-0035	Mean	SE
Necropsy	32.7	10.4	54.8	32.6	12.8

[a] Assuming liver density of 1.0 g/mL.
[b] Stand alone formulations and samples protected from light.
[Sec. 2.6.7.A.6]　Exploratory Single and Multiple Dose Oral Toxicokinetic Study in Rats.　TT#[redacted]-1102

表 2.6.6.A-14 ラットにグラゾプレビルの 50 mg/kg/日 [b] を経口投与後の肝臓中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（個体別値）（投与 15 日）

Time	Animal			Summary	
	09-0037	09-0039	09-0041	Mean	SE
Necropsy	15.1	19.9	8.29	14.4	3.37

[a] Assuming liver density of 1.0 g/mL.
[b] Stand alone formulations and samples protected from light.
[Sec. 2.6.7.A.6]　Exploratory Single and Multiple Dose Oral Toxicokinetic Study in Rats.　TT#[redacted]-1102

表 2.6.6.A-15 ラットにグラゾプレビルの 1000 mg/kg/日 [b] を経口投与後の肝臓中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（個体別値）（投与 2 日）

Time	Animal			Summary	
	09-0043	09-0045	09-0047	Mean	SE
Necropsy	19.9	76.8	78.5	58.4	19.2

[a] Assuming liver density of 1.0 g/mL.
[b] Stand alone formulations and samples protected from light.
[Sec. 2.6.7.A.6]　Exploratory Single and Multiple Dose Oral Toxicokinetic Study in Rats.　TT#[redacted]-1102

表 2.6.6.A-16 ラットにグラゾプレビルの 1000/300 mg/kg/日 [b] を経口投与後の肝臓中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（個体別値）（投与 15 日）

Time	Animal			Summary	
	09-0049	09-0051	09-0053	Mean	SE
Necropsy	26.1	20.1	54.9	33.7	10.7

[a] Assuming liver density of 1.0 g/mL.
[b] Stand alone formulations and samples protected from light. Animals received 1000 mg/kg/day until Study Day 10 and 300 mg/kg/day onwards.
[Sec. 2.6.7.A.6]　Exploratory Single and Multiple Dose Oral Toxicokinetic Study in Rats.　TT#[redacted]-1102

全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）及び C_{max} の個体間におけるばらつきや本試験で使用した動物数を考慮すると、全身曝露量及び C_{max} に、各投与液の調整方法の違い、投与液に対する遮光の有無、血液、血漿及び肝臓を取り扱う際の遮光の有無並びに分析施設（DMPK 及び BTAC）による差異はみられなかった。

50 mg/kg 投与時（又は50 mg/kg/日投与時）の全身曝露及び C_{max} は、1000 mg/kg 投与時（又は1000 mg/kg/日投与時）よりも約4倍高かった。1000 mg/kg 投与時（又は1000 mg/kg/日投与時）での低い全身曝露は、高用量投与液の物性（懸濁液）により吸収が制限されたことによると考えら

Confidential

れた。投与1及び14日の全身曝露及び C_{max} に関して、50及び300 mg/kg/日投与時は、同程度と考えられた。

グラゾプレビルの肝臓中薬物濃度にも個体間で大きなばらつきがみられたが、全身曝露量と肝臓中薬物濃度との間に相関関係は認められなかった。

結論として、グラゾプレビルの溶液（50 mg/kg/日群の投与液）は、懸濁液（300及び1000 mg/kg/日群の投与液）と比較して良好な吸収を示した。ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（FOB を含む）において50 mg/kg/日群でみられた低い全身曝露は、全身曝露の個体間及び試験間のばらつきによるものと考えられ、また1000 mg/kg/日群でみられた低い全身曝露は、高用量投与液の物性（懸濁液）により吸収が制限されたことによると考えられた。以降のラット試験においては、溶液での投与可能な最高用量である200 mg/kg を1日2回投与することで到達可能な最大曝露量を得ることができると考えられた。

2.6.6.A.3.6　ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験［機能観察総合評価（FOB）及び投与2週後の中間剖検を含む）（TT#[redacted]-1120）

[資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120]

本試験の目的は、グラゾプレビルをラットに約2週間及び1ヵ月間経口投与したときの毒性及びTK プロファイルを評価すること、及び前述のラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（FOB を含む）（TT#[redacted]-1152）[2.6.7.A.7C 項]よりも高い曝露が得られると考えられる投与量での、初回又は b.i.d.での2回目投与後の神経系への影響を評価することであった（TT#[redacted]-1120）[2.6.7.A.7D 項]。

Crl:WI（Han）ラット（各群雌雄各10あるいは20匹）にグラゾプレビル（カリウム塩）の50及び200 mg/kg/日を1日1回あるいは0（対照群）及び200 mg/kg を b.i.d.投与（投与間隔は最低6時間）した。被験物質は媒体である100% PEG 400に溶解し、対照群には媒体のみを投与した。対照群、50 mg/kg/日群及び200 mg/kg b.i.d.群では、投与開始から2週間後に各群雌雄各10匹を、投与期間終了時に各群雌雄各10匹を剖検した。最高用量を、溶液での投与可能な最高用量である200 mg/kg の1日2回投与とすることで、到達可能な最大曝露量を得ることができると考えられた。

通常の評価項目に加え、対照群及び投与群の肝臓中薬物濃度を測定し、また雄ラットにおいて初回投与後又は b.i.d.での2回目投与後に FOB を実施した。

すべての投薬群の雌雄で投与後に一過性の流涎が認められた。程度はごく軽度で一過性であることから、本化合物が中枢を介して及ぼした影響ではなく、嗜好上の理由によるものと考えられ、毒性学的意義は低いと考えられた。

臓器重量、剖検時の肉眼検査及び病理組織学的検査で投薬に関連した変化はみられなかった。

FOB で、投薬に関連した変化はみられなかった。

TK パラメータを[表 2.6.6.A-17]、[表 2.6.6.A-18]、[表 2.6.6.A-19]及び[表 2.6.6.A-20]に示す。

Confidential

表 2.6.6.A-17 ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 2 週）

Dose	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
50 mg/kg/day	Female	74.4 ± 10.9	23.6 ± 1.62	2.0 ± NC
	Male	73.1 ± 24.0	18.6 ± 9.16	2.0 ± NC
	All	73.8 ± 13.0	21.1 ± 4.31	2.0 ± NC
200 mg/kg b.i.d.[a]	Female	300 ± 87.2	28.5 ± 14.6	2.0 ± NC
	Male	188 ± 51.8	23.2 ± 5.83	1.0 ± NC
	All	251 ± 53.4	25.2 ± 9.75	2.0 ± NC

NC = Not Calculated
[a] The interval between the 2 daily doses was of a minimum of 6 hours.
All grazoprevir concentrations in plasma from control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.0136 μM) at 2 hours postdose.
[Sec. 2.6.7.A.7D]　One-Month Oral Toxicity Study in Rats With a Functional Observational Battery (FOB) With a 2-Week Interim Necropsy.　TT#[redacted]-1120

表 2.6.6.A-18 ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 4 週）

Dose	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
50 mg/kg/day	Female	25.8 ± 9.75	7.72 ± 4.17	2.0 ± NC
	Male	38.4 ± 17.0	15.4 ± 8.53	2.0 ± NC
	All	32.1 ± 9.39	11.6 ± 4.58	2.0 ± NC
200 mg/kg/day	Female	92.4 ± 13.3	21.4 ± 3.39	1.0 ± NC
	Male	142 ± 58.0	34.0 ± 12.9	2.0 ± NC
	All	117 ± 29.8	26.9 ± 6.63	2.0 ± NC
200 mg/kg b.i.d.[a]	Female	156 ± 57.2	17.7 ± 4.36	8.0 ± NC
	Male	267 ± 118	22.9 ± 12.5	2.0 ± NC
	All	212 ± 63.0	17.7 ± 6.45	2.0 ± NC

NC = Not Calculated
[a] The interval between the 2 daily doses was of a minimum of 6 hours.
All grazoprevir concentrations in plasma from control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.0136 μM) at 2 hours postdose.
[Sec. 2.6.7.A.7D]　One-Month Oral Toxicity Study in Rats With a Functional Observational Battery (FOB) With a 2-Week Interim Necropsy. TT#[redacted]-1120

表 2.6.6.A-19 ラットにおける肝臓中グラゾプレビル濃度（平均）（投与 3 週、中間剖検）

Grazoprevir		
Sexes Combined		
Concentrations (μM)[a] of Grazoprevir		
Vehicle	50 mg/kg/day	200 mg/kg b.i.d.
0.0118 ± ID	24.2 ± 3.97	24.3 ± 3.25

ID = Insufficient Data.
Low level of Grazoprevir was measured in 1 male of 18 control animals in Study Week 3 at necropsy. The liver concentration was less than 0.9% of the low dose mean liver concentration.
[a] Assuming liver density of 1.0 g/mL.
[Sec. 2.6.7.A.7D]　One-Month Oral Toxicity Study in Rats With a Functional Observational Battery (FOB) With a 2-Week Interim Necropsy.　TT#[redacted]-1120

Confidential

表 2.6.6.A-20 ラットにおける肝臓中グラゾプレビル濃度（平均）（投与 5 週、最終剖検）

Grazoprevir			
Sexes Combined			
Concentrations (μM)[a] of Grazoprevir			
Vehicle	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	200 mg/kg b.i.d.
0.0167 ± ID	20.1 ± 3.49	13.9 ± 1.60	25.5 ± 3.94

ID = Insufficient Data.
Low levels of Grazoprevir were measured in 1 female and 1 male of 20 control animals in Study Week 5 at necropsy. The liver concentrations were less than 0.9% of the low dose mean liver concentration.
[a] Assuming liver density of 1.0 g/mL.
[Sec. 2.6.7.A.7D]　One-Month Oral Toxicity Study in Rats With a Functional Observational Battery (FOB) With a 2-Week Interim Necropsy.　TT#[redacted]-1120

すべての投与群及び各採血日において、血漿中濃度のばらつきが大きかった。全投与群の投与2週及び4週において、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値に性差（雌雄間で2倍以上の差）はみられなかった。個体間におけるばらつきを考慮すると、50及び200 mg/kg/日群間の全身曝露量平均値はほぼ用量に比例し、C_{max} 平均値は50及び200 mg/kg/日、並びに200 mg/kg b.i.d.で同様と考えられた。50 mg/kg/日群において、投与2週及び4週の全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値には2倍の差があるようにみえるが、これは個体間でのばらつきが大きいためと考えられ、よって投与2週及び4週の全身曝露量平均値及び C_{max} は同程度と考えられた。200 mg/kg b.i.d.群において、投与2週及び4週の全身曝露量及び C_{max} は同程度であると考えられた。投与2週及び4週の対照群の投与2時間後の血漿中グラゾプレビル濃度は、生体試料中薬物濃度分析にて LLQ 未満であった。

中間剖検（投与3週）及び最終剖検（投与5週）において、全投与群で肝臓中濃度のばらつきが大きかった。中間及び最終剖検時の肝臓中濃度平均値は、50及び200 mg/kg/日群、並びに200 mg/kg b.i.d.群で同程度と考えられた。

剖検時、対照群の3例において肝臓中に被験物質が低値で検出された。対照群でみられた肝臓中グラゾプレビル濃度は、投与3週及び5週とも、それぞれの低用量群の肝臓中濃度平均値の0.9%未満であった。低用量群の肝臓中グラゾプレビル濃度と比較して対照群で測定された肝臓中濃度は低かったことから、本所見は本 TK 及び毒性評価の妥当性及び信頼性に影響を与えないと考えられた。

以上の結果から、NOEL は50 mg/kg/日未満であった。投薬に関連した所見は流涎のみであり、この毒性学的意義は低いと考えられることから、NOAEL は200 mg/kg b.i.d.（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 212 ± 63.0 μM·hr）以上であった。

2.6.6.A.3.7　ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6014）

[資料4.2.3.2.7: TT#[redacted]-6014]

本試験の目的は、ラットにグラゾプレビルを約6ヵ月間経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを評価することであった（TT#[redacted]-6014）[2.6.7.A.7E 項]。

Crl:WI（Han）ラット（各群雌雄各15匹）にグラゾプレビル（カリウム塩）の50又は200 mg/kg/

Confidential

日を1日1回あるいは0（対照群）又は200 mg/kg を b.i.d.経口投与した。媒体として、100% PEG 400を使用し、対照群には媒体のみを投与した。最高用量を、溶液での投与可能な最高用量である200 mg/kg の1日2回投与とすることで､到達可能な最大曝露量を得ることができると考えられた。

通常の評価項目に加え、対照群及び投与群の肝臓中グラゾプレビル濃度を測定した。

投与期間中、すべての投薬群の雌雄で投与後に一過性の流涎が認められた。また、血清生化学的検査において、200 mg/kg/日群の雌1例及び200 mg/kg b.i.d.群の雌雄で総ビリルビンの増加（対照群の雌雄における最高値が0.2 mg/dL であったのに対し200 mg/kg/日群の雌1例は0.3 mg/dL、200 mg/kg b.i.d.群の雌雄各15匹中雌4例及び雄2例は0.3又は0.4 mg/dL を示した）、200 mg/kg b.i.d.群の雌でナトリウム、クロライド及びカリウムのごく軽度な減少がみられた。流涎に関して、その程度はごく軽度で一過性であることから、本化合物が中枢を介して及ぼした影響ではなく、嗜好上の理由によるものと考えられ、毒性学的意義は低いと考えられた。また、血清生化学検査における変化は、その程度が低く病理組織学的変化を伴わないことから毒性学的意義は低いと考えられた。

病理組織学的検査では、200 mg/kg b.i.d.群の雄で腺胃粘膜において限局性出血がみられた。200 mg/kg b.i.d.群での全身曝露は雌雄で同様であり、また200 mg/kg/日群（1日1回投与）の全身曝露とも同様であることから、本所見は、グラゾプレビルを1日2回投与したことで胃粘膜に直接接触する時間が長期化したためと考えられた。性差に関しては、200 mg/kg b.i.d.群において、雄が雌よりも体重が重く、より大量の投与液を投与されたため生じたと考えられた。本薬を6ヵ月間投与したことによる慢性的な変化はないことから、雄のみで認められた本所見の毒性学的意義は低いと考えられた。

グラゾプレビルの投与4、9及び13週の血漿中濃度における TK パラメータ平均値及び最終剖検日（投与27週）の肝臓中濃度平均値を[表 2.6.6.A-21]、[表 2.6.6.A-22]、[表 2.6.6.A-23]及び[表 2.6.6.A-24]に示す。

Confidential

表 2.6.6.A-21 ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 4 週）

Dose	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
50 mg/kg/day	Female	108 ± 24.4	21.0 ± 3.09	2.0 ± NC
	Male	63.2 ± 18.0	18.1 ± 5.77	2.0 ± NC
	All	85.4 ± 14.8	19.6 ± 3.00	2.0 ± NC
200 mg/kg/day	Female	476 ± 134	62.9 ± 14.6	2.0 ± NC
	Male	260 ± 81.5	36.3 ± 15.6	2.0 ± NC
	All	368 ± 83.5	49.6 ± 11.3	2.0 ± NC
200 mg/kg b.i.d.[a]	Female	390 ± 85.0	60.1 ± 11.5	8.0 ± NC
	Male	232 ± 45.3	39.6 ± 3.85	8.0 ± NC
	All	311 ± 47.3	49.9 ± 6.84	8.0 ± NC

NC = Not Calculated
[a] The interval between the 2 daily doses was 6 to 7 hours.
All MK-5172 concentrations in plasma from control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.013 μM) at 2 hours postdose.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.7E]　Six-Month Oral Toxicity Study in Rats.　TT#[redacted]-6014

表 2.6.6.A-22 ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 9 週）

Dose	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
50 mg/kg/day	Female	105 ± 25.1	29.4 ± 1.05	2.0 ± NC
	Male	116 ± 27.1	18.1 ± 3.69	2.0 ± NC
	All	110 ± 17.9	23.8 ± 3.05	2.0 ± NC
200 mg/kg/day	Female	563 ± 182	60.0 ± 8.19	2.0 ± NC
	Male	179 ± 35.9	30.1 ± 1.86	1.0 ± NC
	All	371 ± 110	41.0 ± 9.56	2.0 ± NC
200 mg/kg b.i.d.[a]	Female	392 ± 82.2	40.6 ± 8.29	2.0 ± NC
	Male	341 ± 60.3	37.2 ± 13.0	8.0 ± NC
	All	367 ± 49.9	37.7 ± 4.63	2.0 ± NC

NC = Not Calculated
[a] The interval between the 2 daily doses was 6 to 7 hours.
All MK-5172 concentrations in plasma from control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.014 μM) at 2 hours postdose.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.7E]　Six-Month Oral Toxicity Study in Rats.　TT#[redacted]-6014

Confidential

表 2.6.6.A-23 ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 13 週）

Dose	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
50 mg/kg/day	Female	88.0 ± 15.7	20.4 ± 0.525	2.0 ± NC
	Male	119 ± 27.3	29.5 ± 6.75	2.0 ± NC
	All	103 ± 15.2	25.0 ± 3.65	2.0 ± NC
200 mg/kg/day	Female	321 ± 77.2	40.0 ± 7.03	2.0 ± NC
	Male	419 ± 68.4	52.9 ± 3.12	2.0 ± NC
	All	370 ± 49.4	46.4 ± 4.48	2.0 ± NC
200 mg/kg b.i.d.[a]	Female	365 ± 81.7	29.0 ± 15.8	2.0 ± NC
	Male	525 ± 168	43.0 ± 10.7	8.0 ± NC
	All	445 ± 88.5	32.8 ± 9.55	10 ± NC

NC = Not Calculated
[a] The interval between the 2 daily doses was 6 to 7 hours.
All MK-5172 concentrations in plasma from control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.014 μM) at 2 hours postdose.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.7E]　Six-Month Oral Toxicity Study in Rats.　TT#[redacted]-6014

表 2.6.6.A-24 ラットにグラゾプレビルを経口投与後の肝臓中グラゾプレビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）（投与 27 週：最終剖検）

Dose	
Vehicle [b]	0.00968 ± 0.00968
50 mg/kg/day	29.8 ± 3.87
200 mg/kg/day	41.8 ± 7.47
200 mg/kg b.i.d.[b]	24.3 ± 3.39

[a] Assuming liver density of 1.0 g/mL.
[b] The interval between the 2 daily doses was 6 to 7 hours.
Low level of MK-5172 was measured above the lower limit of quantitation (LLQ = 0.110 μM) in 1 control animal, and was less than 1 % of the mean liver concentration of the low dose group. This had no impact on the quality and integrity of the study.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.7E]　Six-Month Oral Toxicity Study in Rats.　TT#[redacted]-6014

血漿中濃度はすべての投与群でばらつきが大きかった。全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値及び C_{max} 平均値に性差はみられなかった。投与4、9及び13週における全身曝露量平均値の増加率は、50～200 mg/kg の用量範囲でほぼ用量比であり、C_{max} 平均値の増加率は用量比を下回った。200 mg/kg/日及び200 mg/kg b.i.d.の全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値は投与4、9及び13週で同様であった。各投与群において投与4、9及び13週の全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値はそれぞれ同様であったことから、投与13週まで定常状態が維持されていたことが示唆された。対照群において投与4、9及び13週の投与2時間後の血漿中グラゾプレビル濃度は、生体試料中薬物濃度分析にて LLQ 未満であった。

投与27週（最終剖検時）の肝臓中濃度平均値に性差はみられず、個体間におけるばらつきが大きいことを考慮すると、肝臓中濃度平均値は全投与群において同様であった。剖検時、対照群の1例において肝臓中に被験物質が低値で検出された。対照群でみられた肝臓中グラゾプレビル濃度は、低用量群の肝臓中濃度平均値の1%未満であった。低用量群の肝臓中グラゾプレビル濃度と比

Confidential

較して対照群の肝臓中濃度は低かったことから、本所見は本 TK 及び毒性評価の妥当性及び信頼性に影響を与えないと考えられた。

以上の結果より、NOEL は50 mg/kg/日未満であったが、本試験でみられた投薬に関連したすべての変化は毒性学的意義が低いと考えられたことから、NOAEL は200 mg/kg b.i.d.（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝445 ± 88.5 μM·hr）以上であった。

2.6.6.A.3.8　イヌの9日間漸増経口投与忍容性試験（TT#[redacted]-1119）

[資料4.2.3.2.8: TT#[redacted]-1119]

本試験の目的は、イヌにグラゾプレビルの3用量を、ウオッシュアウト期間を設けずに各3日間漸増経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを評価し、以降のイヌの反復投与毒性試験の用量を設定することであった（TT#[redacted]-1119）[2.6.7.A.6 項]。

ビーグル（雄2匹）にグラゾプレビル（カリウム塩）の3、30及び300 mg/kg/日を各3日間漸増経口投与した。媒体として100% PEG 400を使用した。

毒性評価は、死亡、一般状態観察、体重、摂餌量、並びに項目を限定した臨床検査及び剖検・病理組織学的検査により実施した。グラゾプレビルの血漿中濃度は、各投与量について測定した。

試験期間中に死亡はみられなかった。

一般状態観察では、300 mg/kg/日の投与で嘔吐（泡沫状）がみられた。

血清生化学的検査では、300 mg/kg/日の投与で総ビリルビンの増加（軽度、1例）並びにアルブミン及びカルシウムの減少が認められた。

剖検及び病理組織学的検査では、投薬に関連した変化はみられなかった。

TK パラメータを[表 2.6.6.A-25]に示す。

表 2.6.6.A-25 イヌの血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ

	Grazoprevir (mg/kg/day)		
	Males		
	3	30	300
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	8.4	659	1689
C_{max} (μM)	2.7	52	111
T_{max} (hr)	2.0	2.5	6
Notebook Reference:　0286601/0008; 0263529-0012.			

[Sec. 2.6.7.A.6]　Exploratory 9-Day Oral Rising-Dose Tolerability Study in Dogs.　TT#[redacted]-1119

全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、3～30 mg/kg/日の用量範囲で用量比を上回り、30～300 mg/kg の用量範囲で用量比を下回った。

Confidential

2.6.6.A.3.9　イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-1151）

[資料4.2.3.2.9: TT#[redacted]-1151]

本試験の目的は、イヌにグラゾプレビルを約1ヵ月間経口（カプセル）投与したときの毒性及びTK プロファイルを評価することであった（TT#[redacted]-1151）[2.6.7.A.7F 項]。

ビーグル（各群雌雄各3匹）にグラゾプレビル（カリウム塩）の0（対照群）、5、20及び600 mg/kg/日を経口投与した。媒体として、100% PEG 400を使用し、対照群には媒体のみを投与した。最高用量は、予備的な忍容性試験の結果に基づいて、毒性が発現すると考えられ、ヒト臨床曝露量に比べて50倍を超える高い全身曝露が得られると考えられる用量とした。

試験期間中に死亡はみられなかった。

600 mg/kg/日群で、嘔吐、赤血球系パラメータ（赤血球、ヘモグロビン、網状赤血球及びヘマトクリット）の軽度な減少、総ビリルビンの軽度～中等度の増加（対照群と比較して最高5倍）及び精上皮の変性がみられた。これらの変化はほとんど有害でないと考えられた。嘔吐は動物の一般状態に影響を与えなかった。血液検査所見について、その程度はごく軽度であり、病理組織学的変化を伴わなかった。ビリルビン増加について、その程度は中等度であったが肝毒性を示す他のバイオマーカー（AST、ALT、ALP）の変化や、病理組織学的に関連した変化を伴わなかった。雄の全例にみられた精上皮の変性について、その程度はごく軽度～軽度であり、回復性がある[資料4.3: 1]と考えられた。よって、いずれの変化も毒性学的な意義は低いと考えられた。

20 mg/kg/日群の雄1例でも総ビリルビンのごく軽度の増加（投与前値と比較して2倍）がみられたが、その程度は低く、肝毒性を示す他のバイオマーカー（AST、ALT、ALP）の変化や、病理組織学的に関連した変化を伴わなかったことから毒性学的な意義は低いと考えられた。

TK パラメータを[表 2.6.6.A-26]及び[表 2.6.6.A-27]に示す。

表 2.6.6.A-26 イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 1 日 [a]）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5	Female	76.3 ± 9.14	11.9 ± 1.22	2.0 ± 0.0
	Male	60.6 ± 5.45	11.1 ± 1.10	2.0 ± 0.0
	All	68.5 ± 5.92	11.5 ± 0.757	2.0 ± 0.0
20	Female	544 ± 77.5	41.8 ± 6.20	4.0 ± 0.0
	Male	566 ± 87.7	43.8 ± 5.51	3.3 ± 0.67
	All	555 ± 52.6	42.8 ± 3.74	3.7 ± 0.33
600	Female	1550 ± 698	99.6 ± 41.5	4.2 ± 2.2
	Male	1560 ± 329	110 ± 17.9	4.0 ± 0.0
	All	1560 ± 345	105 ± 20.3	4.1 ± 0.97

a　MK-5172 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation of the bioanalytical method.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.7F]　One-Month Oral Toxicity Study in Dogs.　TT#[redacted]-1151

Confidential

表 2.6.6.A-27 イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 5 週 [a]）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5	Female	83.1 ± 2.40	10.1 ± 0.627	2.7 ± 0.67
	Male	47.6 ± 5.22	7.49 ± 0.220	2.0 ± 0.0
	All	65.4 ± 8.35	8.78 ± 0.647	2.3 ± 0.33
20	Female	564 ± 178	45.2 ± 10.8	3.3 ± 0.67
	Male	429 ± 54.5	39.3 ± 5.12	2.0 ± 0.0
	All	497 ± 88.6	42.3 ± 5.52	2.7 ± 0.42
600	Female	3300 ± 624	178 ± 30.5	5.3 ± 1.3
	Male	2560 ± 125	168 ± 16.5	4.0 ± 0.0
	All	2930 ± 330	173 ± 15.7	4.7 ± 0.67

a　MK-5172 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation of the bioanalytical method.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.7F]　One-Month Oral Toxicity Study in Dogs.　TT#[redacted]-1151

全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値に性差（雌雄間で2倍以上の差）はみられなかった。投与1日及び5週における全身曝露量の増加率は、5～20 mg/kg/日の用量範囲では用量比を上回り、20～600 mg/kg/日の用量範囲では用量比を下回った。投与1日及び5週における C_{max} の増加率は、5～20 mg/kg/日の用量範囲ではほぼ用量に比例し、20～600 mg/kg/日の用量範囲では用量比を下回った。低用量及び中用量において、投与1日及び5週の全身曝露量及び C_{max} はそれぞれ同様であったことから、これらの投与量における定常状態は投与初日に到達し、投与5週まで維持されたことが示唆された。高用量の全身曝露量及び C_{max} は、投与1日よりも投与5週で軽度に上昇していたことから、本用量では消失が遅いためにわずかに蓄積した可能性が示唆された。対照群の全例において、投与1日及び5週の血漿中グラゾプレビル濃度は、生体試料中薬物濃度分析にて LLQ 未満であった。

以上の結果より、NOEL は5 mg/kg/日であったが、20 mg/kg/日群でみられた変化は毒性学的意義が低いと考えられたことから、NOAEL は20 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝497 ± 88.6 μM·hr）であった。

2.6.6.A.3.10　イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験（投与3ヵ月後の中間剖検を含む）（TT#[redacted]-6015）

[資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015]

本試験の目的は、イヌにグラゾプレビルを1日1回約3又は9ヵ月間経口（カプセル）投与したときの毒性及び TK プロファイルを評価することであった（TT#[redacted]-6015）[2.6.7.A.7G 項]。

ビーグル［各群雌雄各4あるいは7匹（低用量群のみ）］にグラゾプレビル（カリウム塩）の0（対照群）、5、15及び300 mg/kg/日（高用量群は投与12週に100 mg/kg/日に減量）を約38週間投与した。媒体として100% PEG 400を使用し、対照群には媒体のみを投与した。5 mg/kg/日群の雌雄各3例は3ヵ月後（投与14週）に剖検した（中間剖検）。最高用量は毒性が発現し、ヒト臨床曝露量に比べて50倍を超える高い全身曝露が得られると考えられる用量とした。

通常の評価項目に加え、全群について、グラゾプレビルの肝臓中濃度を測定した。

Confidential

投与期間中、15 mg/kg/日以上の群で投薬に関連した変化がみられた。300 mg/kg/日群では、不十分な摂餌量／食欲不振による過度の体重減少（投与前値と比較して最高-22%）がみられたことから、雄1例（投与7週）及び雌1例（投与11週）を早期屠殺し、投与12週に投与量を300 mg/kg/日から100 mg/kg/日に減量した。摂餌量及び体重の減少に加え、同群では対照群と比較して無形便／液状便（雌）及び投与後の嘔吐の増加、糞便の褪色（黄色）、皮膚及び結膜の黄色化（1例）、赤血球系パラメータの軽度な減少、フィブリノーゲン及び血小板の軽度な増加、総ビリルビンの増加（対照群と比較して最高11倍、多くの動物で直接ビリルビン優位）、ALP の増加（4倍未満、雄）、コレステロールの一過性の軽度な減少並びに尿中ビリルビンの増加がみられた。100 mg/kg/日群で、27週間中にみられた所見は300 mg/kg/日投与時とほぼ同様の所見［無形便／液状便（雌）及び投与後の嘔吐（雌）の増加、糞便の褪色（黄色）、体重減少及び不十分な摂餌量／食欲不振（雄1例）、多くの赤血球系パラメータの軽度な減少、フィブリノーゲン及び血小板の軽度な増加、総ビリルビンの増加（対照群と比較して最高7倍、主に直接ビリルビン）、ALP の増加（4倍未満、雄、雌1例で一過性の増加）、コレステロールの一過性の軽度な減少（雄1例）並びに尿中ビリルビンの増加（雄1例）］であった。また、100 mg/kg/日群では、赤血球パラメータの減少とともに、平均赤血球数（雄、投与38週）及び／又は網状赤血球数の平均値又は個々の値の増加、並びに数例において有核赤血球の出現がみられ、これらは再生性の反応である可能性が示唆された。15 mg/kg/日群の雌雄では、総ビリルビンのごく軽度～軽度な増加（対照群と比較して最高3倍）がみられた。

300 mg/kg/日群の早期屠殺した雄1例（投与7週）及び雌1例（投与11週）では、剖検で胆汁の増加を伴う胆嚢の拡張がみられたが、病理組織学的検査では本所見に関連した特異的な変化は認められなかった。雄では粘膜の黄色化、肉眼的に観察された精巣の淡色化及び軟化に関連する精細管の変性、肝臓（類洞細胞）及び骨髄における色素沈着（ヘモジデリン）、十二指腸における限局性炎症並びに骨髄過形成が認められた。雌では骨髄における色素沈着（ヘモジデリン）のみが認められた。

300/100 mg/kg/日群の全例で胆汁の増加を伴う胆嚢の拡張が認められた。また、同群の雄3例中2例で歯肉粘膜、白色脂肪組織あるいは大動脈の黄色化がみられたが、病理組織学的検査でこれら所見に関連した特異的な変化はみられなかった。器官重量測定では、肝重量の増加（病理組織学的検査で関連した特異的な変化なし）が300/100 mg/kg/日群の雌雄で、精巣重量の減少（用量依存性あり）が15 mg/kg/日以上の群で認められた。病理組織学的検査では、15 mg/kg/日以上の群で肝臓、胆嚢及び精巣に、300/100 mg/kg/日群で脾臓、骨髄及び精巣上体に変化がみられた。300/100 mg/kg/日群の雌雄で肝臓の類洞細胞においてごく軽度～軽度の色素沈着（ヘモジデリン）がみられた。15 mg/kg/日以上の群で大型胆管内腔におけるごく軽度の微石症が認められることがあり、胆嚢内腔における同様の所見が300/100 mg/kg/日群の雌雄及び15 mg/kg/日群の雌1例でもみられた。胆管及び胆嚢において、これら微石症に関連した病理組織学的な変化は認められなかった。300/100 mg/kg/日群の雄で脾臓における色素沈着（ヘモジデリン）が、同群の雌雄で脾臓における髄外造血の増加がみられた。また、300/100 mg/kg/日群の雄1例で骨髄における赤血球系細胞の過形成が認められた。15 mg/kg/日以上の群で精細管変性がみられており、その程度及び発現頻

Confidential

度には用量依存性（15 mg/kg/日群の雄1例：ごく軽度、300/100 mg/kg/日群の雄3例：中等度～重度）が認められた。本所見に関連した精巣重量の減少もみられ、中等度から重度の例では精巣上体管に変化は認められないものの、管腔における精子数が高度に減少していた。

投与1日（全投与群）、投与3週（300 mg/kg/日群）、4週（5及び15 mg/kg/日群）、投与12週（全投与群）、投与16週（300/100 mg/kg/日群）及び投与26週（300/100 mg/kg/日群）の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ平均値を[表 2.6.6.A-28]、[表 2.6.6.A-29]、[表 2.6.6.A-30]、[表 2.6.6.A-31]、[表 2.6.6.A-32]及び[表 2.6.6.A-33]に示す。

表 2.6.6.A-28 イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 1 日）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5	Female	83.7 ± 10.7	10.9 ± 1.13	2.1 ± 0.34
	Male	78.3 ± 16.8	11.1 ± 1.12	1.3 ± 0.21
	All	81.2 ± 9.26	11.0 ± 0.768	1.8 ± 0.23
15	Female	472 ± 14.3	44.6 ± 2.63	1.8 ± 0.25
	Male	352 ± 19.7	35.0 ± 2.90	2.5 ± 0.50
	All	412 ± 25.3	39.8 ± 2.56	2.1 ± 0.30
300	Female	2550 ± 376	138 ± 15.1	7.0 ± 1.0
	Male	2470 ± 1170	142 ± 58.0	6.0 ± 1.2
	All	2510 ± 569	140 ± 27.7	6.5 ± 0.73

MK-5172 concentrations below lower limit of quantitation in control plasma samples.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy.
TT#[redacted]-6015

表 2.6.6.A-29 イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 3 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
300	Female	1910 ± 686	116 ± 31.3	4.5 ± 1.3
	Male	2980 ± 846	143 ± 30.4	5.0 ± 1.7
	All	2440 ± 543	129 ± 20.8	4.8 ± 1.0

[Sec. 2.6.7.A.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy.
TT#[redacted]-6015

Confidential

表 2.6.6.A-30 イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 4 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5	Female	86.3 ± 14.7	12.8 ± 1.54	1.7 ± 0.18
	Male	54.8 ± 8.26	9.08 ± 1.01	1.4 ± 0.20
	All	70.5 ± 9.21	10.9 ± 1.02	1.6 ± 0.14
15	Female	382 ± 58.9	35.9 ± 3.69	2.5 ± 0.50
	Male	289 ± 37.0	27.8 ± 3.05	2.5 ± 0.50
	All	335 ± 36.7	31.8 ± 2.70	2.5 ± 0.33

MK-5172 concentrations below lower limit of quantitation in control plasma samples.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy.
TT#[redacted]-6015

表 2.6.6.A-31 イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 12 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5	Female	69.8 ± 9.45	11.2 ± 1.36	1.6 ± 0.20
	Male	68.9 ± 8.17	10.6 ± 0.917	1.7 ± 0.18
	All	69.3 ± 6.00	10.9 ± 0.793	1.6 ± 0.13
15	Female	431 ± 80.0	42.1 ± 6.81	2.5 ± 0.50
	Male	303 ± 103	26.7 ± 9.34	2.6 ± 0.85
	All	367 ± 65.0	34.4 ± 6.09	2.6 ± 0.46
300	Female	3340 ± 1610	200 ± 92.8	5.3 ± 1.3
	Male	1900 ± 142	126 ± 6.11	5.3 ± 1.3
	All	2620 ± 792	163 ± 44.8	5.3 ± 0.84

MK-5172 concentrations below lower limit of quantitation in control plasma samples.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy.
TT#[redacted]6015

表 2.6.6.A-32 イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 16 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
100[a]	Female	1950 ± 1040	118 ± 50.9	2.7 ± 0.67
	Male	3030 ± 225	183 ± 20.0	4.0 ± 0.0
	All	2490 ± 532	150 ± 28.6	3.3 ± 0.42

[a] The original dose (300 mg/kg/day) was lowered to 100 mg/kg/day from Study Day 79 (Study Week 12).
[Sec. 2.6.7.A.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy.
TT#[redacted]-6015

Confidential

表 2.6.6.A-33 イヌにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 26 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
100[a]	Female	2420 ± 771	150 ± 38.9	5.3 ± 1.3
	Male	2170 ± 893	133 ± 42.8	4.0 ± 0.0
	All	2300 ± 531	142 ± 26.2	4.7 ± 0.67

a　The original dose (300 mg/kg/day) was lowered to 100 mg/kg/day from Study Day 79 (Study Week 12).
[Sec. 2.6.7.A.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy.
TT#[redacted]-6015

肝臓中のグラゾプレビル濃度（雌雄合算値）は、中間剖検（投与3ヵ月）時の5 mg/kg/日群で4.82 μM、最終剖検時の5、15及び100 mg/kg/日群でそれぞれ6.14、39.3及び136 μM であった。対照群の肝臓中グラゾプレビル濃度は LLQ 未満であった。

300 mg/kg/日群の早期屠殺例2例では、最終投与後のそれぞれ投与7週又は11週における TK パラメータ（雄及び雌の $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ は3610及び3240 μM·hr、C_{max} は171及び149 μM、T_{max} は4.0及び8.0 hr）は、同用量群の生存例から得られた値と類似していた。また、屠殺時の肝臓中薬物濃度は、雄及び雌でそれぞれ363及び356 μM であった。

100及び300 mg/kg/日群において、個体間に大きなばらつきがみられた。全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）又は C_{max} の平均値に性差はみられなかった。投与1日、投与4週及び投与12週における全身曝露量平均値の増加率は、5～15 mg/kg の用量範囲で用量比を上回り、C_{max} 平均値の増加率はほぼ用量に比例した。投与1日及び投与12週における全身曝露量及び C_{max} の平均値の増加率は、15～300 mg/kg の用量範囲で用量比を下回った。全身曝露量及び C_{max} の平均値は、5及び15 mg/kg/日群では投与1日、投与4週及び投与12週、並びに300 mg/kg/日群では投与1日、投与3週及び投与12週で同様であり、投与初日に定常状態に到達していたことが示唆された。100 mg/kg/日群では全身曝露量及び C_{max} の平均値は、投与16週及び投与26週で同様であり、また、300 mg/kg/日投与時の値とも同様であった。投与1日、投与4週及び投与12週における対照群の血漿グラゾプレビル濃度は、いずれも LLQ（LLQ = 0.013/0.014 μM）未満であった。

肝臓中グラゾプレビル濃度平均値に性差（雌雄間で2倍以上の差）はみられなかった。5 mg/kg/日群の投与14週（中間剖検）及び投与39週（最終剖検）の肝臓中薬物濃度平均値は同様であった。投与39週の肝臓中薬物濃度平均値は、15 mg/kg/日群と比較して100 mg/kg/日群で約3倍高く、5 mg/kg/日群と比較して15 mg/kg/日群で約6倍高かった。投与39週における対照群の肝臓中グラゾプレビル濃度は LLQ（LLQ＝0.104 M）未満であった。

以上の結果から、本試験における NOEL は5 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝69.3 ± 6.0 μM·hr）であった。15 mg/kg/日群でみられたビリルビンの増加について、その程度は軽度であり、投与期間中に進行せず、肝胆道系毒性を示す他のバイオマーカー（AST、ALT、ALP の増加）の変化や、病理組織学的に関連する変化を伴わなかった。胆嚢及び大型胆管内腔でみられた微石症はごく軽度なものであり、胆嚢及び肝臓に病理組織学的な変化が認められていないことから、本所見の毒性学的意義は低いと考えられた。また精原細胞より成熟した精子の減少を特徴とする精細管の変性は、その程度がごく軽度であり、回復性を有することが予測される[資料4.3: 1]ことから、毒性学的意義

Confidential

は低いと考えられた。よって、本試験における NOAEL は15 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝367 ± 65.0 μM·hr）であった。

2.6.6.A.4　遺伝毒性試験

グラゾプレビルの遺伝毒性について、ICH ガイダンスに従って標準的な組合せの in vitro［細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）（TT#[redacted]-8000、TT#[redacted]-8011）、染色体異常試験（TT#[redacted]-8686、TT#[redacted]-8600）］及び in vivo［ラットの小核試験（TT#[redacted]-8813、TT#[redacted]-8734）］遺伝毒性試験を実施したところ、グラゾプレビルに遺伝毒性は認められなかった。

2.6.6.A.4.1　In vitro 試験

2.6.6.A.4.1.1　細菌を用いる復帰突然変異試験（TT#[redacted]-8000、TT#[redacted]-8011）

[資料4.2.3.3.1.1: TT#[redacted]-8000]

ネズミチフス菌（TA1535、TA97a、TA98及び TA100）及び大腸菌（WP2 uvrA pKM101）を用いた復帰突然変異試験を実施し、グラゾプレビルの変異原性を評価した（TT#[redacted]-8000、TT#[redacted]-8011）[2.6.7.A.8A 項]。

最終評価濃度は、S-9の存在下及び非存在下ともに30（TT#[redacted]-8000のみ）[2.6.7.A.8A 項]、100、300、1000、3000及び5000 μg/plate とした。高用量は、ICH S2A、S2B 及び最新の ICH S2 (R1)ガイダンスで推奨されている用量を選択した。

用量設定試験（TT#[redacted]-8000）[2.6.7.A.8A 項]において、グラゾプレビル処理群は対照群と比較して復帰変異コロニー数に2倍以上の増加を誘発しなかった。陽性対照物質処理により、S-9の存在／非存在下及び試験菌株に応じて復帰変異コロニー数は適切に増加した。3000 μg/plate 以上の試験用量において、多くのプレート上に沈殿物がみられたが、プレート上コロニーの計数には影響しなかった。いずれの用量においても背景の菌の生育阻害はみられなかった。復帰変異体の生育阻害が、TA97a において300 μg/plate 以上の用量で、WP2 uvrA pKM101で1000 μg/plate 以上の用量でみられた。

確認試験（TT#[redacted]-8011）[2.6.7.A.8A 項]は GLP 適合下で実施した。その結果は、用量設定試験（TT#[redacted]-8000）[2.6.7.A.8A 項]でみられた陰性の結果が確認された。

結論として、グラゾプレビルの2試験で実施したすべての試験菌株において、グラゾプレビル処理群は対照群と比較して復帰変異コロニー数に2倍以上の用量関連性の増加を誘発しなかったことから、グラゾプレビルに変異原性はないと考えられた。

2.6.6.A.4.1.2　チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いる in vitro 染色体異常試験（TT#[redacted]-8686、TT#[redacted]-8600）

[資料4.2.3.3.1.2: TT#[redacted]-8600]

チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO 細胞：WBL サブクローン）を用いた染色体異常試験を実施し、グラゾプレビルの染色体異常誘発能について評価した（TT#[redacted]-8686、TT#[redacted]-8600）

Confidential

[2.6.7.A.8B 項]。

用量設定試験及び染色体異常試験は、S-9存在／非存在下での3時間処理、S-9非存在下での連続処理（約20時間）の2つの処理法で実施した。陰性対照群は1%ジメチルスルホキシド（DMSO）で処理した。陽性対照物質として、S-9存在下ではシクロホスファミドを、S-9非存在下ではマイトマイシン C を用いた。処理開始から約20時間後（正常な細胞周期の約1.5倍）に細胞を固定して染色体異常を評価した。

用量設定試験（TT#[redacted]-8686）[2.6.7.A.8B 項]で著明な細胞増殖抑制が認められたため、染色体異常試験の最高用量は細胞毒性に基づいて選択した。

染色体異常試験（TT#[redacted]-8600）[2.6.7.A.8B 項]で著明な細胞毒性が認められたため、染色体異常を評価した最高用量は、細胞増殖抑制が陰性対照の50%を大きく超えない用量とした。染色体異常の観察は、S-9存在下では20、25及び50 μM（3時間処理）で、S-9非存在下では20、30及び50 μM（3時間処理）又は10、20及び30 μM（20時間処理）の用量で実施した。最高用量における細胞増殖は、陰性対照と比較してそれぞれ46%、52%及び55%であり、これよりわずかにでも高用量となると強い細胞毒性が認められた。

グラゾプレビル処理群における染色体異常を有する細胞の割合は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示さず、かつ代表的な背景データの範囲内であった。倍数体細胞の割合に一貫した又は用量に依存した増加はみられず、倍数体と核内倍加を合算した最高値は代表的な背景データの範囲内であった。

高用量の陽性対照群における染色体異常を有する細胞の割合は、陰性対照群と比較して顕著な増加を示した。

以上より、本試験において、細胞毒性に基づいた最高用量まで、グラゾプレビルに染色体異常誘発能はみられなかった。

2.6.6.A.4.2　In vivo 試験

2.6.6.A.4.2.1　ラットの小核試験（ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験内で実施）（TT#[redacted]-8813）

[資料4.2.3.3.2.1: TT#[redacted]-8813]

ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-1152）[2.6.7.A.7C 項]において、雌雄ラットの骨髄多染性赤血球におけるグラゾプレビルの小核誘発能を評価した（TT#[redacted]-8813）[2.6.7.A.9A 項]。

Crl:WI（Han）ラット（各群雌雄各10匹）に、グラゾプレビルの0（対照群）、25、50又は1000 mg/kg/日を1ヵ月間経口投与した。媒体は100% PEG 400を用い、対照群には媒体のみを投与した。最高用量は限界量とした。毒性及び全身曝露データについては、TT#[redacted]-1152[2.6.7.A.7C 項]及びTT#[redacted]-8813[2.6.7.A.9A 項]に示す。TT#[redacted]-1152において、投薬に関連した死亡はみられず、投薬に関連した唯一の変化は一過性の流涎であった。

グラゾプレビルの25、50及び1000 mg/kg/日群について小核の計数を実施した。計数には、陽性対照として、雄ラットにマイトマイシン C を投与し、スライドを作成してコード化したものも含めた。媒体対照群と比較して、すべてのグラゾプレビル投薬群で小核を有する多染性赤血球

Confidential

（MN-PCE）頻度に統計学的に有意な増加はみられず、用量に関連した小核発現頻度の増加傾向もみられなかった。グラゾプレビル投与による骨髄 PCE の比率に対する影響もみられなかった。

以上より、雌雄ラットにグラゾプレビルを25、50及び1000 mg/kg/日の投与量で約1ヵ月間経口投与しても、骨髄での小核誘発能は認められなかった。

2.6.6.A.4.2.2　ラットの小核試験（投与2週後の中間解剖を含むラットの1ヵ月間経口投与毒性試験内で実施）（TT#[redacted]-8734）

[資料4.2.3.3.2.2: TT#[redacted]-8734]

初回に実施したラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-1152）[2.6.7.A.7C 項]において、全身曝露量が予想外に低い結果となったため、より高い曝露が得られると考えられる投与量を設定して投与2週後の中間解剖を含むラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-1120）[2.6.7.A.7D 項]を別途実施し、雌雄ラットの骨髄多染性赤血球におけるグラゾプレビルの小核誘発能を評価した（TT#[redacted]-8734）[2.6.7.A.9B 項]。

Crl:WI（Han）ラット（各群雌雄各10あるいは20匹）にグラゾプレビル（カリウム塩）の50及び200 mg/kg/日を1日1回あるいは0（対照群）及び200 mg/kg を b.i.d.投与（投与間隔は最低6時間）した。媒体として100% PEG 400を用い、対照群には媒体のみを投与した。対照群、50 mg/kg/日群及び200 mg/kg b.i.d.群では、投与開始から2週間後に各群雌雄各10匹を、投与期間終了時に各群雌雄各10匹を剖検した。最高用量を、溶液での投与可能な最高用量である200 mg/kg の1日2回投与とすることで、到達可能な最大曝露量を得ることができると考えられた。

中間剖検時の50 mg/kg/日群及び200 mg/kg b.i.d.（400 mg/kg/日）群、最終剖検時の50及び200 mg/kg/日群、並びに200 mg/kg b.i.d.（400 mg/kg/日）群について、小核の計数を実施した。計数には、陽性対照として、雄ラットにマイトマイシン C を投与し、スライドを作成してコード化したものも含めた。すべてのグラゾプレビル投薬群について、結果は陰性であり、MN-PCE 頻度は媒体投与時の代表的な背景データの範囲内であった。グラゾプレビル投与による骨髄 PCE の比率に対する影響もみられなかった。

以上より、雌雄ラットにグラゾプレビルを50及び200 mg/kg/日、並びに200 mg/kg b.i.d.の投与量で約1ヵ月間経口投与しても、グラゾプレビルによる骨髄での小核誘発能は認められなかった。

2.6.6.A.5　がん原性試験

グラゾプレビルは、臨床で予定される連続投与期間が6ヵ月未満であり、慢性あるいは再発性の病態の治療において間欠的な方法で頻繁に用いられるものではなく、標準的な組合せの遺伝毒性試験でいずれの遺伝毒性も認められず、慢性毒性試験でいずれの増殖性の徴候の証拠も認められなかった。これらのことから、グラゾプレビルは患者の寿命の相当な期間にわたって規則的に投薬されることが予想されるものではなく、ICH S1A ガイダンスに従って、がん原性試験は実施しなかった。

Confidential

2.6.6.A.6　生殖発生毒性試験

グラゾプレビルの生殖発生毒性について検討するため、ラット及びウサギを用いて試験を実施した。これらの試験の概要を、[表 2.6.6.A-34]に示す。ウサギの生殖発生毒性試験において、いずれの経口投与用調製物もヒト全身曝露量の数倍に値する全身曝露に到達しなかったため、ウサギの胚・胎児発生に関する試験のために静脈内投与用調製物を開発した。

表 2.6.6.A-34 グラゾプレビルの生殖発生毒性試験（重要な試験）

Study	Species/Sex	Study Type	Doses Evaluated (mg/kg/day)	Formulation
TT#[redacted]-7260	Rat/F & M	Fertility	0, 50, 200, 200 b.i.d.[a]	100% PEG 400
TT#[redacted]-7050	Rat/F	EFD	0, 50, 200, 200 b.i.d.[a]	100% PEG 400
TT#[redacted]-7300	Rabbit/F	EFD[b]	0, 25, 50, 100[c]	Nanosuspension[d]
TT#[redacted]-7010	Rat/F	PPND	0, 25, 100, 200 b.i.d.[a]	100% PEG 400

[a] High dose expected to result in highest achievable systemic plasma exposure.
[b] Study conducted via the intravenous route.
[c] The high dose is the maximum tolerated intravenous dose.
[d] Nanosuspension: grazoprevir in 0.15% polyvinylpyrrolidone K16-18/0.036% sodium deoxycholate/5% mannitol in deionized water.
EFD = Embryo-fetal developmental toxicity study.
F = Female.
M = Male.
PEG = Polyethylene glycol.
PPND = Prenatal and postnatal developmental toxicity study.

[Sec. 2.6.7.A.12A; 2.6.7.A.13A; 2.6.7.A.13B; 2.6.7.A.14]

2.6.6.A.6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.6.A.6.1.1　雌雄ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験（経口投与）（TT#[redacted]-7260）

[資料4.2.3.5.1.1: TT#[redacted]-7260]

グラゾプレビルの F_0雌雄ラットに対する受胎能への影響を検討するため、雌雄ラットにグラゾプレビルを1日1回又は1日2回、交配前の15日間、交配期間、雌に関しては妊娠7日（GD 7）又は同居終了日まで、雄に関しては計画屠殺の前日まで（約計6週間）経口投与した。（TT#[redacted]-7260）[2.6.7.A.12A 項]。

Crl:WI（Han）ラット（各群雌雄各20匹）にグラゾプレビル（カリウム塩）の50及び200 mg/kg/日を1日1回あるいは0（対照群）及び200 mg/kg を約6時間間隔で b.i.d.経口投与した。媒体として100% PEG 400を用い、対照群には媒体のみを投与した。無処置群として雌雄各20匹を設定し、交配期間中にそれぞれ高用量群の雄及び雌と交配させた。最高用量（200 mg/kg b.i.d.）での全身曝露は、到達可能な最大曝露量である。

雌雄ラットの毒性評価は、死亡、一般状態、体重、摂餌量及び剖検（胸部及び腹部臓器）により実施した。雄では、精巣重量、精子数及び精子運動性の評価も実施した。雌ラットにグラゾプレビルを15日間投与後、雄ラットと1対1で最大20日間（20夜）同居させ、交配及び生殖成績を評価した。高用量群の雄は無処置群の雌と、高用量群の雌は無処置群の雄とそれぞれ同居させた。また、対照群、低用量群及び中用量群の雌は、それぞれ同用量群の雄と同居させた。GD15～17に交配した雌を帝王切開し、胚／胎児生存率及び黄体数の評価を実施した。

Confidential

雌雄ラットに死亡はみられず、一般状態、平均体重増加量及び摂餌量に投薬に関連した変化はみられなかった。また、剖検時の肉眼所見にも投薬に関連した変化はみられなかった。

いずれの投与量においても、生殖発生毒性パラメータに投薬に関連した変化はみられなかった。

以上の結果より、雌雄ラットの一般毒性及び受胎能に関する NOEL は200 mg/kg b.i.d. ［$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝212 ± 63.0 μM·hr、ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-1120）[2.6.7.A.7D 項]から引用］以上であった。

2.6.6.A.6.2　胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.A.6.2.1　妊娠ラットの経口投与による用量設定探索試験（TT#[redacted]-7055）

[資料4.2.3.5.2.1: TT#[redacted]-7055]

本試験の目的は、妊娠ラットにグラゾプレビルを GD 6～20に経口投与したときの胚・胎児発生に対する影響を評価すること及び、以降に続く試験で使用する投与量を検討することであった（TT#[redacted]-7055）[2.6.7.A.11 項]。

妊娠していると想定される雌の Crl:WI（Han）ラットを GD 0（交尾確認日）に群分けし（各群6匹）、グラゾプレビル（カリウム塩）の0（1日1回対照群）、50、100及び200 mg/kg/日を1日1回あるいは0（b.i.d.対照群）及び200 mg/kg を b.i.d.（約6時間間隔）で、GD 6～20に経口投与した。媒体として、100% PEG 400を使用し、対照群には媒体を1日1回又は1日2回投与した。先に実施したラットの毒性試験では、最高用量である200 mg/kg b.i.d.の投与で到達可能な最大曝露量が得られた。

母動物の毒性評価は、死亡、一般状態、体重及び摂餌量により実施した。母動物のすべての生存例は GD 21に帝王切開し、黄体数及び胎盤（肉眼）の評価を含む子宮内内容物の評価を実施した。胚・胎児発生毒性の評価は、胚／胎児生存率、胎児体重、性比及び外表観察により実施した。

投薬に関連した死亡はみられなかった。

母動物の一般状態、平均体重増加量及び平均摂餌量に投薬に関連した変化はみられなかった。

いずれの投与量においても、胚・胎児発生毒性パラメータに投薬に関連した変化はみられなかった。

以上の結果より、ラットの胚・胎児発生に関する試験において200 mg/kg b.i.d.は最高用量として推奨された。

2.6.6.A.6.2.2　ラットの経口投与による胚・胎児発生毒性試験（出生前評価を含む）（TT#[redacted]-7050）

[資料4.2.3.5.2.2: TT#[redacted]-7050]

妊娠ラットにグラゾプレビルを GD 6～20に経口投与したときの胚･胎児発生毒性について評価した。さらに、GD 15にグラゾプレビルの TK プロファイルを評価した（TT#[redacted]-7050）[2.6.7.A.13A 項]。

妊娠していると想定される雌の Crl:WI（Han）ラットを GD 0（交尾確認日）に群分けし、50及び200 mg/kg/日を1日1回（雌各28匹）あるいは0（対照群、雌24匹）及び200 mg/kg（雌28匹）を約

Confidential

6時間間隔で b.i.d.、GD 6～20に経口投与した。媒体として100% PEG 400を使用し、対照群には媒体を投与した。先に実施したラットの毒性試験では、最高用量である200 mg/kg b.i.d.の投与で到達可能な最大曝露量が得られた。

母動物の毒性評価は、死亡、一般状態、体重、摂餌量及び剖検（胸部及び腹部臓器）により実施した。GD 15に、対照群及び投与群のサテライト動物（非絶食下）から採血を行い、TK 分析に用いた。これらの動物は最終採血後に屠殺した。その他の母動物のすべての生存例は GD 21に帝王切開し、黄体数及び胎盤（肉眼）の評価を含む子宮内内容物の評価を実施した。胚・胎児発生毒性の評価は、胚／胎児生存率、胎児体重、性比並びに外表、内臓、頭部及び骨格観察により実施した。骨格観察は、アリザリンレッド染色及びマイクロ CT を用いて実施した。

すべての動物は予定された剖検日まで生存した。

母動物の一般状態、平均体重増加量及び平均摂餌量に投薬に関連した変化はみられなかった。

いずれの投与量においても、胚・胎児発生毒性パラメータに投薬に関連した変化はみられなかった。

TK パラメータを[表 2.6.6.A-35]に示す。

表 2.6.6.A-35 妊娠ラットの血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（妊娠 15 日）

	Grazoprevir[a]		
	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	200 mg/kg b.i.d.[b]
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	160 ± 53.5	133 ± 67.5	217 ± 23.5
C_{max} (μM)	23.4 ± 4.93	17.2 ± 9.41	48.1 ± 3.28
T_{max} (hr)	2.0 ± NC	2.0 ± NC	8.0 ± NC

[a] No drug levels detected above LLQ of the bioanalytical method in control plasma samples.
[b] Dosed approximately 6 hours apart.
NC = Not calculated.

[Sec. 2.6.7.A.13A]　Oral Developmental Toxicity Study in Rats With Prenatal Evaluation.　TT#[redacted]-7050

血漿中濃度はすべての投薬群の母動物個体間でばらつきが大きかった。個体間におけるばらつきを考慮すると、50及び200 mg/kg/日群間の全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値は同様であった。200 mg/kg b.i.d.群の全身曝露量平均値は、200 mg/kg/日群と比較して約1.6倍、C_{max} 平均値は約2.8倍の高値を示した。対照群のすべての母動物において、GD 15の投与2時間後の血漿中グラゾプレビル濃度は、生体試料中薬物濃度分析にて LLQ 未満であった。

以上の結果から、母動物及び胚・胎児発生毒性における NOEL は200 mg/kg b.i.d.（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝217 ± 23.5 μM·hr）以上であった。

Confidential

2.6.6.A.6.2.3　非妊娠ウサギの経口投与トキシコキネティクス探索試験（TT#[redacted]-7047、TT#[redacted]-7048、TT#[redacted]-7049、TT#[redacted]-7046、TT#[redacted]-7044、TT#[redacted]-7042、TT#[redacted]-7127）

[資料4.2.3.5.2.3: TT#[redacted]-7047][資料4.2.3.5.2.4: TT#[redacted]-7048][資料4.2.3.5.2.5: TT#[redacted]-7049]
[資料4.2.3.5.2.6: TT#[redacted]-7046][資料4.2.3.5.2.7: TT#[redacted]-7044][資料4.2.3.5.2.8: TT#[redacted]-7042]
[資料4.2.3.5.2.9: TT#[redacted]-7127]

非妊娠ウサギの経口投与 TK 試験を複数実施し、経口投与によるウサギの胚・胎児発生に関する試験において使用する投与液を検討した。これらの試験の概要を[表 2.6.6.A-36]に、TK データを[2.6.7.A.2 項]に示す。各試験で検討した投与液によるグラゾプレビルの全身曝露は、概して個体間及び試験間でばらつきが大きかった。しかし、100% PEG 400を媒体としたグラゾプレビルの投与液が最も高い曝露を示したため、これをウサギの胚・胎児発生に関する試験において使用する投与液とした。ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験（経口投与）（TT#[redacted]-7040）[2.6.7.A.11 項]において、PEG 400の投与容量（1 mL/kg b.i.d.、すなわち2 mL/kg/日）に関連した過度の毒性が母動物にみられたことから、PEG 400の投与容量を下げて（0.5 mL/kg b.i.d.、すなわち1 mL/kg/日）調製したグラゾプレビルの投与液、また、0.5%メチルセルロース／0.02% SLS 水溶液を媒体としたグラゾプレビル（噴霧乾燥調製物）投与液について、さらに検討を行った（[表 2.6.6.A-36]：それぞれの試験番号は TT#[redacted]-7042及び TT#[redacted]-7127）。これら2つの投与液においても、グラゾプレビルの全身曝露量が個体間で大きくばらついたため、経口投与によるウサギの胚・胎児発生に関する試験に使用する投与液には適さないと考えられた。よって、グラゾプレビルの静脈内投与調製物を開発した。

Confidential

表 2.6.6.A-36 非妊娠ウサギの経口投与トキシコキネティクス試験の概要

Study	Dose Levels (mg/kg/day)	Comments
Exploratory Oral Single Dose Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits TT#[redacted]-7047 (Non-GLP)	25, 50, 100, 200, 425 mg/kg	Tested vehicle: 100% PEG 400[a] TK parameters: See [Sec. 2.6.7.A.11]
Exploratory Oral Single Dose Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits TT#[redacted]-7048 (Non-GLP)	50, 200 mg/kg	Tested vehicles: 10% PS 80 in DI water[b], Imwitor 742/PS 80 (1:1 w/w)[a] TK parameters: See [Sec. 2.6.7.A.11]
Exploratory Oral Two-Day Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits TT#[redacted]-7049 (Non-GLP)	200 mg/kg b.i.d. in either 100% PEG 400[c] or Imwitor 742/PS 80[d], 350 mg/kg in Imwitor 742/PS 80	Tested vehicles: 100% PEG 400[a], Imwitor 742/PS 80 (1:1 w/w)[a] TK parameters: See [Sec. 2.6.7.A.11]
Exploratory Oral 9-Day Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits TT#[redacted]-7046 (Non-GLP)	200 mg/kg b.i.d.[e] in either 100% PEG 400 or imwitor 742/PS 80	Tested vehicles: 100% PEG 400[a], Imwitor 742/PS 80 (1:1 w/w)[a] TK parameters: See [Sec. 2.6.7.A.11]
Exploratory Oral Single Dose Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits TT#[redacted]-7044 (Non-GLP)	SDF: 200, 625 mg/kg NF: 200, 480 mg/kg	Tested formulations: Grazoprevir SDF in 0.5% MC/0.02% SLS in DI water[b] and grazoprevir NF in DI water[b] TK parameters: See [Sec. 2.6.7.A.11]

Confidential

表 2.6.6.A-36 非妊娠ウサギの経口投与トキシコキネティクス試験の概要（続き）

Study	Dose Levels (mg/kg/day)	Comments
Exploratory One-Week Oral Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits TT#[redacted]-7042 (Non-GLP)	25, 50, 100, 125 mg/kg b.i.d.[d]	Tested vehicle: 100% PEG 400[f] TK parameters: See [Sec. 2.6.7.A.11]
Exploratory Five-Day Oral Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits TT#[redacted]-7127 (Non-GLP)	100, 200, 400 mg/kg/day 100 mg/kg b.i.d.[e] 200, 400 mg/kg b.i.d.[d]	Tested formulation: Grazoprevir SDF in 0.5% MC/0.02% SLS in DI water[b] TK parameters: See [Sec. 2.6.7.A.11]

[a] Dosing volume: 1 mL/kg/dose, *i.e.* 2 mL/kg/day when dosed b.i.d.
[b] Dosing volume: 5 mL/kg.
[c] 6 hours apart.
[d] 4 hours apart.
[e] 4- and 6- hours apart tested.
[f] Dosing volume: 0.5 mL/kg/dose, *i.e.* 1 mL/kg/day when dosed b.i.d.
b.i.d. = Bis in die.
DI = Deionized.
MC = Methylcellulose.
PEG 400 = Polyethylene glycol 400.
PS 80 = Polysorbate 80.
SDF = Spray-dried formulation.
NF = Nanomilled formulation.
SLS = Sodium lauryl sulfate.
TK = Toxicokinetic.

[Sec. 2.6.7.A.11]

2.6.6.A.6.2.4　ウサギの胚・胎児発生に関する予備試験（経口投与）（TT#[redacted]-7040）

[資料4.2.3.5.2.10: TT#[redacted]-7040]

妊娠ウサギにグラゾプレビルを GD 7～20に経口投与し、ウサギの胚・胎児発生に対する毒性を評価した（TT#[redacted]-7040）[2.6.7.A.11 項]。さらに、GD 15にグラゾプレビルの TK プロファイルを評価した。

妊娠していると想定される雌の Dutch Belted ウサギを GD 0（交尾確認日）に群分けし（各群雌26匹）、グラゾプレビル（カリウム塩）の50及び200 mg/kg/日を1日1回あるいは0（対照群）及び200 mg/kg を b.i.d.で、GD 7～20に経口投与した。対照群には、媒体である100% PEG 400を1日2回投与した。投与量容量は、1回の投与当たり1 mL/kg とした。最高用量は、到達可能な最大曝露量を得ることができると考えられる用量とした。

母動物の毒性評価は、死亡、一般状態、体重、摂餌量及び剖検（胸部及び腹部臓器）により実施した。対照群及び投与群のサテライト動物（非絶食下）から GD 15に採血を行い、血漿中薬物濃度を測定した。これらの動物は最終採血後に屠殺した。その他の母動物のすべての生存例は GD 28に帝王切開し、黄体数及び胎盤（肉眼）の評価を含む子宮内内容物の評価を実施した。胚・胎児発生毒性の評価は、胚／胎児生存率、胎児体重、性比並びに外表、内臓及び頭部観察により実施した。骨格はアリザリンレッド染色及びマイクロ CT を実施したが、評価は実施しなかった。

対照群及び200 mg/kg b.i.d.群の母動物では、PEG 400（2 mL/kg/日）を投与したことによる媒体

Confidential

投与に関連した過度の毒性として、両群において帝王切開可能な母動物数が減少した（対照群で10匹、200 mg/kg b.i.d.群で12匹）。これら2群ではICH S5 (R2)ガイドラインにおいて推奨されている母動物数を下回ったことから、本試験をウサギの胚・胎児発生に関する予備試験へと変更した。

対照群及び200 mg/kg b.i.d.群の母動物では、媒体投与に関連した過度の毒性として、GD 7～11に死亡、無形便及び体重の減少が、また、概して投与期間中に摂餌量の減少がみられた。

50及び200 mg/kg/日群の母動物（1日1回投与）では、投薬に関連した変化はみられなかった。

胎児検査では、対照群及び200 mg/kg b.i.d.群で胚／胎児生存率（平均着床後死亡率の増加）に媒体投与に関連した変化が認められ、母動物あたりの平均生存胎児数が減少した。

50及び200 mg/kg/日群では、投薬に関連した変化はみられなかった。

TK パラメータを[表 2.6.6.A-37]に示す。

表 2.6.6.A-37 妊娠ウサギにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（妊娠 15 日）

Dose	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
50 mg/kg/day	0.507 ± 0.366	0.200 ± 0.185	6.0 ± NC
200 mg/kg/day	1.08 ± 0.501	0.347 ± 0.256	6.0 ± NC
200 mg/kg b.i.d.	3.61 ± 0.806	0.440 ± 0.304	6.0 ± NC

NC = Not Calculated
The second daily dose was administered at least 4 hours after the last dose of the respective first dosing session.
MK-5172 concentrations in maternal plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.0137 μM).
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.11]　Preliminary Oral Developmental Toxicicity Study in Rabbits.
TT#[redacted]-7040

血漿中薬物濃度に関して、個体間で大きなばらつきがみられた。全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、50～200 mg/kg/日の用量範囲で用量比を下回った。200 mg kg b.i.d.群は200 mg/kg/日と比べて、全身曝露量平均値が約3.3倍、C_{max} 平均値が約1.3倍高かった。対照群のすべての母動物において、GD 15の血漿中グラゾプレビル濃度は、生体試料中薬物濃度分析にて LLQ 未満であった。

以上の結果から、50及び200 mg/kg/日群（1日1回投与）では、母動物及び胚・胎児に投薬に関連した変化はみられなかった。対照群及び200 mg/kg b.i.d.群では、PEG 400（2 mL/kg/日）を投与したことにより母動物及び胚・胎児に過度の毒性がみられた。全身曝露量は予想外に低く、概して非妊娠ウサギより低かった。

2.6.6.A.6.2.5　非妊娠ウサギの5日間静脈内投与トキシコキネティクス及び忍容性探索試験（TT#[redacted]-7126）

[資料4.2.3.5.2.11: TT#[redacted]-7126]

上述の複数のウサギの探索試験（経口投与）で得られた全身曝露と比較して、より高く、より再現可能な全身曝露を得るため、グラゾプレビルの静脈内投与用調製物を開発した。本試験の目

Confidential

的は、非妊娠ウサギにグラゾプレビルのナノ粒子懸濁液を5日間静脈内投与したときの TK プロファイル及び忍容性を評価することであった（TT#[redacted]-7126）[2.6.7.A.11 項]。

Dutch Belted ウサギを5群（各群雌4匹）に群分けし、そのうちの3群に0.15%ポリビニルピロリドン K16-18（PVP）／0.036%デオキシコール酸ナトリウム（DCA）／5%マンニトール水溶液を媒体として調製したグラゾプレビルの50、100及び200 mg/kg/日を、残りの2群に生理食塩液又はプラセボ（0.15% PVP／0.036% DCA／5%マンニトール）を投与した。投与容量を2 mL/kg、投与速度を約1.5 mL/分とし、投与液を1日1回5日間耳静脈内に投与した。

毒性評価は、動物の死亡、一般状態、体重及び摂餌量により実施した。投薬群については血漿中薬物濃度を測定した。

試験終了時まですべての動物は生存し、その後、動物コロニーに戻した。

投薬に関連した一般状態の変化はみられなかった。

投与1～5日間の体重増加量は、プラセボ対照群で平均2 g（範囲：-6～+19 g）であったのに対して、200 mg/kg/日群で平均-26g（範囲：-75～+28g）であった。この平均体重減少量は、投与1日の平均体重の約1%であった。摂餌量は、プラセボ対照群と比較して200 mg/kg/日群でわずかに減少した。50及び100 mg/kg/日群は、平均体重増加量及び平均摂餌量ともプラセボ対照群と同様であった。

投与5日目の TK パラメータを[表 2.6.6.A-38]に示す。採血時点が限られているため、$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ のみ算出した。

表 2.6.6.A-38 非妊娠ウサギにグラゾプレビルを静脈内投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 5 日）

Dose (mg/kg/day)	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)
50	35 ± 2
100	128 ± 48
200	273 ± 33

[Sec. 2.6.7.A.11]　Exploratory 5-Day Intravenous Toxicokinetic and Tolerability Study in Nonpregnant Rabbits.　TT#[redacted]-7126

全身曝露量平均値の増加率は、50～100 mg/kg/日の用量範囲で用量比を上回り、100～200 mg/kg/日の用量範囲で用量に比例した。

以上の結果より、非妊娠ウサギにグラゾプレビルの50、100及び200 mg/kg/日を5日間静脈内投与したところ、概して忍容性は良好であった。

2.6.6.A.6.2.6　ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験（静脈内投与）（TT#[redacted]-7001）

[資料4.2.3.5.2.12: TT#[redacted]-7001]

妊娠ウサギにグラゾプレビルを GD 7～20に静脈内投与し、ウサギの胚・胎児発生に対する毒性を評価した。さらに、GD 15にグラゾプレビルの TK プロファイルを評価した（TT#[redacted]-7001）[2.6.7.A.11 項]。

Dutch Belted ウサギ（交配日を揃えた、妊娠していると想定される雌ウサギ、各群12匹）にグ

Confidential

ラゾプレビル（ナノ粒子懸濁液）の0（対照群）、50、100及び200 mg/kg/日を GD 7～20（GD 0：交尾確認日）に耳静脈内投与した（投与速度：1.5 mL/分）。媒体として0.15% PVP／0.036% DCA／5%マンニトール水溶液を使用し、対照群には媒体を投与した。投与容量は2 mL/kg とした。グラゾプレビルの媒体への最大懸濁濃度は100 mg/mL であった（ナノ粒子懸濁液）。最高用量は、この最大懸濁濃度及び静脈内投与容量の2 mL/kg から決定された。

母動物の毒性評価は、死亡、一般状態、体重及び摂餌量により実施した。対照群及び投与群のサテライト動物（非絶食下）から GD 15に採血を行い、血漿中薬物濃度を測定した。これらの動物は最終採血後に屠殺した。その他の母動物のすべての生存例は GD 28に帝王切開し、黄体数及び胎盤（肉眼）の評価を含む子宮内内容物の評価を実施した。胚・胎児発生毒性の評価は、胚／胎児生存率、胎児体重、性比並びに外表、内臓及び骨格観察により実施した。骨格観察では、アリザリンレッド染色及びマイクロ CT を実施した。

200 mg/kg/日群では、投薬に関連して一般状態の悪化及び死亡がみられた。2例で GD 7又は GD 8に一般状態が悪化し（痙攣様症状、側臥位、活動性の低下あるいは開脚など）、投与後に死亡した。過度の毒性が認められたため、同群の他のウサギについても、屠殺した。この他に死亡又は投薬に関連した一般状態の変化はみられなかった。

母動物の平均体重増加量及び平均摂餌量に変化はみられなかった。

50及び100 mg/kg/日群では、胚・胎児発生毒性は認められなかった。

TK パラメータを[表 2.6.6.A-39]に示す。

表 2.6.6.A-39 妊娠ウサギにグラゾプレビルを静脈内投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（妊娠 15 日）

Dose (mg/kg/day)	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max}[a] (μM)	T_{max} (hr)
50	25.0 ± 2.39	27.4 ± 6.40	0.19 ± 0.11
100	83.3 ± 6.86	76.3 ± 5.49	0.080 ± 0.0

[a] Highest mean concentration first observed.
IV administration from GD 7 to GD 15 with an injection rate of 1.5 mL/min.
MK-5172 concentrations in maternal plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.013 μM) of the bioanalytical method.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.11]　Preliminary Intravenous Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rabbits.　TT#[redacted]-7001

全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、50～100 mg/kg/日の用量範囲で用量比を上回った。

以上の結果より、200 mg/kg/日群では12例中2例に、一般状態の悪化（痙攣様症状、側臥位、活動性の低下あるいは開脚など）及び死亡がみられたことから、本用量では忍容性がみられなかった。50及び100 mg/kg/日群では、母動物毒性及び胚・胎児発生毒性は認めなかった。

Confidential

2.6.6.A.6.2.7　ウサギの胚・胎児発生に関する試験（静脈内投与）（TT#[redacted]-7300）

[資料4.2.3.5.2.13: TT#[redacted]-7300]

妊娠ウサギにグラゾプレビルを GD 7～20に静脈内投与し、ウサギの胚・胎児発生に対する毒性を評価した。さらに、GD 15にグラゾプレビルの TK プロファイルを評価した（TT#[redacted]-7300）[2.6.7.A.13B 項]。

Dutch Belted ウサギ（交配日を揃えた、妊娠していると想定される雌ウサギ、各群23匹）にグラゾプレビル（ナノ粒子懸濁液）の0（対照群）、25、50及び100 mg/kg/日を GD 7～20（GD 0：交尾確認日）に耳静脈内投与した（投与速度：1.5 mL/分）。媒体として0.15% PVP／0.036% DCA／5%マンニトール水溶液を使用し、対照群には媒体を投与した。投与容量は2 mL/kg とした。最高用量は、ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験（静脈内投与）（TT#[redacted]-7001）[2.6.7.A.11　項]を基に MTD とした。

母動物の毒性評価は、死亡、一般状態、体重、摂餌量及び剖検（胸部及び腹部臓器）により実施した。対照群を含むすべての投与群のサテライト動物（非絶食下）から GD 15/16に採血を行い、血漿中薬物濃度を測定した。これらの動物は最終採血後に屠殺した。その他の母動物のすべての生存例は GD 28に帝王切開し、黄体数及び胎盤（肉眼）の評価を含む子宮内内容物の評価を実施した。胚・胎児発生毒性の評価は、胚／胎児生存率、胎児体重、性比並びに外表、内臓、頭部及び骨格観察により実施した。骨格観察では、アリザリンレッド染色及びマイクロ CT を用いた。

すべての動物において投薬に関連した死亡はみられなかった。母動物の剖検（胸部及び腹部臓器）ではすべての投薬群で、投薬に関連した所見はみられなかった。

母動物の一般状態、平均体重増加量及び平均摂餌量に投薬に関連した変化はみられなかった。

いずれの投与量においても、胚・胎児発生毒性パラメータに投薬に関連した変化はみられなかった。

TK パラメータを[表 2.6.6.A-40]に示す。

表 2.6.6.A-40 妊娠ウサギにグラゾプレビルを静脈内投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（妊娠 15 日）

Dose (mg/kg/day)	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
25	6.14 ± 0.586	7.36 ± 1.75	0.080 ± 0.0
50	24.4 ± 4.81	33.8 ± 8.71	0.080 ± 0.0
100	76.1 ± 7.44	67.2 ± 3.92	0.080 ± 0.0

IV administration from GD 7 to GD 15 with an injection rate of 1.5 mL/min
MK-5172 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.013 μM) of the bioanalytical method.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.13B]　Intravenous Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rabbits.　TT#[redacted]-7300

GD 15において、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値の増加率は、25～100 mg/kg/日の用量範囲で用量比を上回った。C_{max} 平均値の増加率は、25～50 mg/kg/日の用量範囲で用量比を上回り、50～100 mg/kg/日の用量範囲でほぼ用量に比例した。

Confidential

以上の結果から、本試験における母動物毒性及び胚・胎児発生毒性の NOEL は100 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝76.1 ± 7.44 μM·hr）以上であった。

2.6.6.A.6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.6.A.6.3.1　ラットの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験及びトキシコキネティクス試験（経口投与）（TT#[redacted]-7010）

[資料4.2.3.5.3.1: TT#[redacted]-7010]

F_0妊娠ラット（母動物）にグラゾプレビルを GD 6～授乳20日（LD 20）に経口投与して、F_1出生児の発生、発育、行動、生殖成績及び受胎能に対する影響を評価した。さらに、GD 15にグラゾプレビルの母動物における TK プロファイルを評価した（TT#[redacted]-7010）[2.6.7.A.14 項]。

Crl:WI（Han）ラット（交配日を揃えた雌ラット、対照群：雌24匹、投薬群：各群雌28匹）にグラゾプレビル（カリウム塩）の25及び100 mg/kg/日を1日1回あるいは0（対照群）及び200 mg/kg を b.i.d.で経口投与した。媒体として100% PEG 400を使用し、対照群には媒体のみを投与した。先に実施した複数の試験より、最高用量である200 mg/kg b.i.d.の投与で到達可能な最大曝露量が得られると考えられた。

母動物の毒性評価は、死亡、一般状態、体重、摂餌量及び剖検（胸部及び腹部臓器）により実施した。F_1出生児の毒性評価は、着床後死亡率、外表観察、死亡、一般状態、体重、性成熟、行動検査、生殖成績及び受胎能により実施した。

母動物及び F_1出生児ともに、投薬に関連した死亡はみられなかった。

母動物では、一般状態、平均体重増加量及び平均摂餌量に投薬に関連した変化はみられなかった。

F_1世代では、着床後死亡率、外表観察、死亡、一般状態、体重、性成熟（膣開口あるいは包皮分離）、行動検査（受動的回避学習試験、驚愕反応試験及びオープンフィールド試験）、生殖成績及び受胎能に投薬に関連した影響はみられなかった。

母動物の GD 15の TK パラメータを[表 2.6.6.A-41]に示す。

Confidential

表 2.6.6.A-41 妊娠ラットにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（妊娠 15 日）

Dose	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
25 (mg/kg/day)	Female	20.1 ± 7.02	4.73 ± 1.79	2.0 ± NC
100 (mg/kg/day)		155 ± 52.7	26.8 ± 9.26	2.0 ± NC
200 (mg/kg b.i.d.)		146 ± 37.7	16.5 ± 7.71	2.0 ± NC
NC = Not Calculated.				

Grazoprevir dosing: from Gestation Day 6 to Gestation Day 15.
b.i.d. dosing:　The second dose was administered at least 6 hours after the end of the first dosing.
MK-5172 concentrations in plasma from all control group animals at 2 hours postdose were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.0132 μM) of the bioanalytical method.
MK-5172 = Grazoprevir.
[Sec. 2.6.7.A.14]　Oral Pre- and Postnatal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats.
TT#[redacted]-7010

個体間におけるばらつきを考慮すると、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値及び C_{max} 平均値は、25～100 mg/kg/日の用量範囲では増加率が用量比を上回り、100～200 mg/kg b.i.d.の用量範囲では同様であった。

以上の結果より、発生、発育、行動、生殖成績及び受胎能に投薬に関連した影響はみられず、本試験における母動物毒性及び F_1 出生児の発生毒性における NOEL は200 mg/kg b.i.d.（母動物において最大全身曝露量は100 mg/kg/日で到達、$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 155 ± 52.7 μM·hr）以上であった。

2.6.6.A.6.4　幼若動物を用いた試験

現時点では、グラゾプレビルの小児適用を予定していない。しかし、非臨床試験（概して試験開始時に性成熟前の幼若動物を用いた試験）及び臨床試験からは、年齢に関連した安全性の懸念は認められていない。さらに、グラゾプレビルは授乳ラットの乳汁中へ移行するため、ラットの出生後の発生毒性試験では、授乳期間中に幼若ラットは間接的にグラゾプレビルに曝露されたことになる。よって、一連の非臨床試験により、小児への適応に関する臨床開発を適切に裏付けていると考えられる。

2.6.6.A.7　局所刺激性試験

化合物の取り扱い関するデータを得るためめ、局所刺激性試験（ウシ角膜を用いる混濁度及び透過性試験、並びにウサギの急性皮膚刺激性／腐食性試験）を実施した。

2.6.6.A.7.1　ウシ角膜を用いる混濁度及び透過性試験（BCOP）（TT#[redacted]-7866）

[資料4.2.3.6.1: TT#[redacted]-7866]

5枚のウシ角膜に20%のグラゾプレビル溶液を32℃で4時間曝露した（TT#[redacted]-7866）[2.6.7.A.16 項]。洗浄期間終了後、混濁度及びフルオレセイン透過性を測定した。グラゾプレビルは無刺激性（in vitro 刺激性スコア：-6.37）と分類された。

Confidential

2.6.6.A.7.2　ウサギの急性皮膚刺激性／腐食性試験（TT#[redacted]-7865）

[資料4.2.3.6.2: TT#[redacted]-7865]

本試験の目的は、ウサギの皮膚に被験物質を塗布したときの皮膚刺激性及び腐食性を評価することであった（TT#[redacted]-7865）[2.6.7.A.16 項]。ニュージーランド白色ウサギ（雄3匹）の6 cm 四方のの正常な皮膚に、蒸留水で湿らせた0.5 g のグラゾプレビルを4時間貼付した。パッチ除去後、紅斑及び浮腫について評価した。また、観察期間中に、潰瘍及び壊死、又は組織破壊を示すすべての所見についても評価した。全身毒性評価は、一般状態観察及び体重測定により実施した。観察期間中に紅斑又は浮腫はいずれもみられなかった。被験物質に関連する一般状態及び体重への影響は認められなかった。結論として、グラゾプレビルに皮膚刺激性はないと考えられた。

2.6.6.A.8　その他の毒性試験

2.6.6.A.8.1　抗原性試験

標準的な反復投与毒性試験において、グラゾプレビルの抗原性に起因すると考えられる所見又は変化はみられなかった。よって、抗原性試験は実施しなかった。

2.6.6.A.8.2　免疫毒性試験

ICH S8ガイドライン「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」の2.1.1項に概説されている免疫毒性を示唆する所見、すなわち、顕著な血液学的変化（白血球又はリンパ球の変化）、脾臓、胸腺、リンパ節又は骨髄の臓器重量又は組織像の変化、血清免疫グロブリン濃度の変化を示唆する血清グロブリン濃度の変化、感染発生率の増加、腫瘍発生率の増加はいずれもみられなかった。2.2項の重要性に基づいた評価に述べられているように、一つの要因でもそれが重要な所見である場合、又は単独では十分な根拠とならないが二つ以上の要因が認められた場合は、免疫毒性試験を追加で実施する必要がある場合がある。ラット及びイヌを用いたグラゾプレビルの毒性試験で、免疫毒性を示唆する変化は認められなったことから、免疫毒性試験を別途実施しなかった。

化合物の作業時安全のデータ提供のため、マウスの局所リンパ節試験（LLNA）を実施した。

2.6.6.A.8.2.1　マウスの局所リンパ節試験（LLNA）（TT#[redacted]-7864）

[資料4.2.3.7.2.1: TT#[redacted]-7864]

CBA/J マウス（各群雌5匹）の各耳の背側に、5、10又は25%のグラゾプレビル溶液、25%ヘキシルシンナムアルデヒド（陽性対照）又はジメチルホルムアミド（媒体対照）を1日1回3日間反復して局所塗布した（TT#[redacted]-7864）[2.6.7.A.17 項]。最高濃度は、被験物質が媒体に溶解する最高濃度とした。体重測定及び一般状態観察を実施し、毒性及び皮膚刺激性を示唆する所見について検討した。リンパ節内の増殖性細胞への5-ブロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU）の取り込み量を測定し、溶媒対照群（平均値）に対する各被験物質群の BrdU の取り込み量の比（Stimulation index：SI）を算出した。

被験物質に関連した一般状態又は体重の変化はみられなかった。グラゾプレビルの SI 値は全濃

Confidential

度群において2倍未満であったため、グラゾプレビルに皮膚感作性はないと考えられた。

2.6.6.A.8.3　毒性発現の機序に関する試験

2.6.6.A.8.3.1　臨床試験（PN003試験）で認められた遅発性トランスアミナーゼ上昇についての非臨床動物モデルにおける検討

臨床試験（PN003試験）[資料5.3.5.1.2: 5172P003]において、高用量のグラゾプレビルをペグインターフェロン及びリバビリンと併用した患者の一部で、遅発性のトランスアミナーゼ上昇が認められたことから、rasH2野生型マウス、並びにrasH2野生型の親系統であるC57BL/6及びBALB/cマウスを用いて探索試験を実施した。マウスはトランスアミナーゼの上昇を示した唯一の動物種であり、rasH2野生型マウスはトランスアミナーゼの上昇を最も顕著に示した系統であった。本試験の目的は、rasH2野生型マウスの用量設定試験でみられたトランスアミナーゼの上昇を含む肝胆道系の変化をさらに検討し、臨床試験でみられたトランスアミナーゼ上昇を評価するための非臨床モデル候補を模索することであった。

2.6.6.A.8.3.1.1　rasH2野生型マウス（交雑系）の12週間経口投与バイオマーカー探索試験及び12週間回復性試験（TT#[redacted]-6034）

[資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034]

本試験の目的は、rasH2野生型マウスにグラゾプレビルを1日1回約12週間経口投与したときの、肝胆道系変化を評価することであった。投与期間終了後、約12週間の回復期間を設けた（TT#[redacted]-6034）[2.6.7.A.18A 項]。

rasH2野生型マウス（各群雌雄各50匹）にグラゾプレビル（噴霧乾燥調製物：50%のグラゾプレビル遊離酸及び50%の HPMCP を含有）の0（対照群）、200及び500 mg/kg/日を投与した。媒体として、0.5%メチルセルロース／0.02%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液（5 mM 塩酸含有）を用い、懸濁した。対照群には、最高用量群と同量の HPMCP（噴霧乾燥剤）を含有する媒体を投与した。200及び500 mg/kg/日の投与量は、既に実施した rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-6034）[2.6.7.A.7A 項]でトランスアミナーゼの上昇を含む肝胆道系変化がみられた投与量であった。投与期間は、臨床試験（PN003試験）[資料5.3.5.1.2: 5172P003]での投与期間と同程度とした。

毒性評価は、死亡、一般状態、体重、血清生化学的検査及び剖検・病理組織学的検査により実施した。血清生化学的検査では、アルブミン、AST、ALT、ALP、GLDH 及び総／直接ビリルビンについて評価した。剖検はグラゾプレビル投与約2、4、8及び12週後並びに12週間の回復期間終了時に実施した。病理組織学的検査では、肝臓、胆嚢、小腸、大腸及びパイエル板（腸切片に存在した場合）について評価した。

投与期間中、投薬に関連した死亡が500 mg/kg/日群の雌雄で投与4日から認められたが、これら死亡例に死因となる病理所見は認められなかった。

投与期間中、投薬に関連した変化が両群の雌雄に認められた。500 mg/kg/日群の雌雄で、対照群と比較して、体重減少に続く体重増加量の減少、並びに生化学的検査値の変化［AST の増加（ご

Confidential

く軽度～軽度、最高2倍)、ALT の増加（ごく軽度～中等度、最高4倍)、ALP の増加（ごく軽度、2倍未満)、GLDH の増加（軽度～中等度、最高4倍)、総／直接ビリルビンの増加（重度、最高41倍)、アルブミンの減少（ごく軽度～軽度、最高-12%)］がみられた。200 mg/kg/日群では、雌雄で体重増加量の減少、総／直接ビリルビンの増加（軽度～中等度、最高5倍）及びアルブミンの減少（ごく軽度、最高-6%）が、雄で一過性の体重減少、AST 及び ALP の増加（ごく軽度、2倍未満)がみられた。生化学的検査値の変化は、グラゾプレビル投与開始約2週間後から認められたが、投与期間中に悪化することなく、休薬開始約8週間後には回復がみられた。200及び500 mg/kg/日群の雄において、12週間の回復期間終了まで体重増加量の顕著な減少が継続してみられた。

剖検・病理組織学的検査では、投与期間中及び投与期間終了直後の剖検例で投薬に関連した変化がみられ、回復期間後の剖検例ではみられなかった。200 mg/kg/日以上の群の雌雄で、ごく軽度～軽度の肝細胞サイズの増大がみられた。本所見の程度及びその発症頻度にはおおむね用量依存性が認められており、500 mg/kg/日群の雌雄及び200 mg/kg/日群の雌では肝重量の増加が、500 mg/kg/日群の雌雄数例では肝臓サイズの増大が認められた。肝細胞細胞質の淡明化が、500 mg/kg/日群の雌雄（ごく軽度～中等度）及び200 mg/kg/日群の雌（ごく軽度～軽度）でみられた。投薬に関連して、両群の胆嚢に病理組織学的変化が認められ、概して雄より雌で高頻度であった。胆嚢の好中球性細胞浸潤が500 mg/kg/日群の雌雄（雌：ごく軽度～中等度、雄：ごく軽度～軽度）及び200 mg/kg/日群の雌数例（ごく軽度）で認められた。ごく軽度のびらんが500 mg/kg/日群の雌雄少数例で認められ、この多くは好中球性細胞浸潤に関連した。隣接した肝臓における限局性壊死を伴う胆嚢壁の限局性壊死（ごく軽度）が500 mg/kg/日群の雄1例でみられており、本所見は限局性のびらん性変化が進行したものである可能性がある。胆嚢上皮の過形成（ごく軽度～軽度）が500 mg/kg/日群の雌雄で、多くは投与開始から約8週間後に認められた。小腸では雌雄とも、ごく軽度～中等度の絨毛の萎縮及び上皮の空胞化が500 mg/kg/日群で、ごく軽度の上皮の空胞化が200 mg/kg/日群でみられた。両所見とも、多くが十二指腸に限局してみられた。腸管の病理組織学的変化に関連した剖検所見として、十二指腸の肥厚あるいは蒼白が500 mg/kg/日群でみられた。器官重量測定では、肝重量の変化に加えて、500 mg/kg/日群の雄で投与期間終了時に平均精巣重量の減少が、500 mg/kg/日群の雌雄及び200 mg/kg/日群の雄で投与期間中に平均胸腺重量の一過性の減少がみられた。胸腺重量の変化については、動物の一般状態の悪化によるものと考えられた。

回復期間終了時の病理検査では、器官重量、剖検及び病理組織学的検査（肝臓、胆嚢及び小腸）で投薬に関連した変化はみられず、その他投薬に関連した剖検所見もみられなかった。

以上の結果から、NOAEL は200 mg/kg/日未満であった。しかし、投与期間終了時に認められたすべての所見（体重増加量の減少を除く）は回復期間終了時には認められなかった。

結論として、本試験でみられた肝胆道系及び消化管の変化は、rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-6034）[2.6.7.A.7A 項]又は CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-6038）[2.6.7.A.7B 項]でみられた所見と一致していた。血清生化学的変化（AST、ALT、ALP 又はビリルビンの増加など）は、投与期間に応じて進行せず、8週間以上の回復期間後に完全に回復した。肝臓の病理組織学的変化は、投与期間に応じて進行せず、完全に回復した。胆嚢

Confidential

の病理組織学的変化は、投与期間に応じて程度がわずかに進行したが、回復期間終了時には完全に回復した。

2.6.6.A.8.3.1.2　C57BL/6マウス及び BALB/c マウスの1ヵ月間経口投与探索毒性試験（TT#[redacted]-6039）

[資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039]

本試験の目的は、C57BL/6マウス及び BALB/c マウスにグラゾプレビルを1日1回約1ヵ月間経口投与したときのグラゾプレビルの毒性を評価し、rasH2野生型マウスでみられた肝胆道系の変化に対するマウスの系統による感受性の差について検討することであった（TT#[redacted]-6039）[2.6.7.A.18B 項]。BALB/c マウス及び C57BL/6マウスは rasH2野生型マウスの遺伝的背景である。C57BL/6及び BALB/c マウスを各系統につき3群（各群雌雄10匹）に群分けし、グラゾプレビルの噴霧乾燥調製物［50%のグラゾプレビル遊離酸及び50%（w/w）の HPMCP を含有］の0（対照群）、200及び500 mg/kg/日を投与した。媒体として、0.5%（w/v）メチルセルロース／0.02%（w/v）ラウリル硫酸ナトリウム水溶液（5 mM 塩酸含有）を用い、懸濁した。対照群には、最高用量群と同量の HPMCP を含有する媒体を投与した。200及び500 mg/kg/日の投与量は、rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-6034）[2.6.7.A.7A 項]において、トランスアミナーゼの増加を含む肝胆道系変化がみられた投与量であった。

毒性評価は、死亡、一般状態、体重、血清生化学的検査及び剖検・病理組織学的検査により実施した。

rasH2野生型マウスと同様に、500 mg/kg/日群の両系統の雌雄において、投薬に関連した計画外の死亡が認められたため、本用量は MTD を超えるものであった。これら死亡例に死因となる病理所見は認められなかった。

投与期間中、両系統の雌雄において、200 mg/kg/日以上の群で投薬に関連した変化がみられた。体重増加量及び体重の減少が200 mg/kg/日以上の両系統のマウスで試験期間中を通して認められ、BALB/c マウスの雌のみで試験終了付近で完全な回復が500 mg/kg/日群で、体重増加量の増加が200 mg/kg/日群でみられた。血清生化学的検査では、主要かつ予測された所見として、すべての投薬群で総／直接ビリルビンの増加がみられており、500 mg/kg/日群では重度（対照群が0～0.1 mg/dL であったのに対して最高4.3 mg/dL）の、200 mg/kg/日群では概して中等度（対照群が0～0.1 mg/dL であったのに対して最高0.8 mg/dL）の変化として認められた。その他の所見としては、500 mg/kg/日群では ALT［ごく軽度～軽度；C57BL/6雌雄、BALB/c 雄（最高3倍）］及び ALP［ごく軽度～軽度；BALB/c 雌雄（2倍未満）］の増加が、主に500 mg/kg/日群ではグルコースの増加（軽度～中等度；主に BALB/c 雌雄）（最高＋66%）が、200 mg/kg/日以上の群の BALB/c 雌雄及び500 mg/kg/日群の C57BL/6雄ではコレステロールの増加（軽度～中等度、BALB/c 雌雄：最高＋80%、C57BL/6雄：最高＋31%）が、200 mg/kg/日以上の群では総蛋白（最高-10%）、アルブミン（最高-11%）及びアルブミン／グロブリン比（最高-14%）の減少（ごく軽度～軽度；主に雌）が、200 mg/kg/日以上の BALB/c 雄ではトリグリセリドの減少（-32%）（一過性、ごく軽度）がみられた。

Confidential

病理検査では、用量依存的な肝重量の増加が200 mg/kg/日以上の群の両系統雌雄でみられており、すべての投薬群において肝細胞サイズの増大と関連していた。200 mg/kg/日群の C57BL/6雄を除くすべての投薬群において投薬に関連した病理組織学的変化が認められており、500 mg/kg/日群の両系統雌雄で、腎尿細管上皮の変性並びに十二指腸絨毛先端あるいは近傍の単一細胞の壊死をおおむね伴う小腸上皮の空胞化及び十二指腸における絨毛の萎縮［空胞化発現部位と解剖学的に同部位、(BALB/c 雄を除く)］がみられた。BALB/c マウスの雄では絨毛の萎縮がみられなかったことから、上皮の空胞化及び関連した単一細胞壊死が絨毛の萎縮に先行して発現したと考えられた。さらに門脈周囲部における肝細胞細胞質の淡明化（両系統の雌）、限局性肝細胞壊死（BALB/c 雌雄、雌でのみ関連した混合性細胞浸潤あり）及び胆嚢における炎症（C57BL/6雄1例）がみられた。

200 mg/kg/日群では、限局的な肝細胞壊死［ごく軽度～軽度、BALB/c 雌雄、雌でのみ関連した混合性細胞浸潤（軽度）あり］及び胆嚢における好中球性細胞浸潤（ごく軽度、C57BL/6雌1例）が認められた。

以上の結果から、本試験における NOAEL は200 mg/kg/日未満（両系統、雌雄とも）であった。

結論として、rasH2野生型マウスの親系統である C57BL/6及び BALB/c マウスでみられた肝胆道系及び消化管の変化は、rasH2野生型マウスの1ヵ月間又は12週間試験でみられた変化とおおむね同様の性質（程度はより低い）であったが、本試験では新たな所見として、BALB/c マウスで限局性肝細胞壊死が認められた。BALB/c マウスで認められた限局性肝細胞壊死の原因は不明ではあるが、肝臓又は肝胆嚢中グラゾプレビル濃度の系統差が原因とは考えられなかった。なぜならば、グラゾプレビル投与から約24時間後の肝臓中濃度又は肝胆嚢中濃度は、rasH2野生型マウス（200 mg/kg/日群 : 169 μM、500 mg/kg/日群 : 490 μM）[表 2.6.6.A-4]及び C57BL/6マウス（200 mg/kg/日群：143 μM、500 mg/kg/日群：291 μM）のほうが BALB/c マウス（200 mg/kg/日群：116 μM、500 mg/kg/日群：187 μM）[表 2.6.6.A-42]と比較して高かった。さらに、BALB/c マウスではいずれの用量でも AST の増加はみられず、ALT の増加も500 mg/kg/日群の雄でのみみられたことから、BALB/c マウスの両群雌雄でみられた限局性肝壊死は AST 又は ALT の増加と関連しなかった。

2.6.6.A.8.3.1.3　結論

異なる系統のマウスを用いた探索試験では、トランスアミナーゼの増加は rasH2野生型マウスで最も感受性が高かった。しかし、本マウスモデルは、臨床試験（PN003試験）[資料5.3.5.1.2: 5172P003]でみられた遅発性のトランスアミナーゼ上昇に対して必ずしも最適な非臨床モデルとは言い切れない。本マウスにおけるトランスアミナーゼ上昇は投与初期から認められ、進行せず、投与期間中に回復しなかった。一方、臨床試験（PN003試験）において高用量グラゾプレビル（400 mg 以上）をペグインターフェロン及びリバビリンと併用時の患者で認められた一過性のトランスアミナーゼ上昇は、主に投与開始から約8週以降に認められ、一般的には投与継続中に回復した。

Confidential

2.6.6.A.8.3.2　非臨床動物種を用いたグラゾプレビルの胆管膜トランスポーター阻害に関する検討

膜ベシクルを用いた in vitro アッセイにおいて、グラゾプレビルはヒト胆管膜トランスポーターである BSEP、MRP2、MRP3、MRP4、OATP1B1及び OATP1B3を阻害し、それぞれの IC_{50}値は、0.15、2.5、3.8、1.0、0.7及び1.1 μM であった[2.6.4.A.7.2 項]。グラゾプレビルの胆管膜トランスポーター阻害により、胆汁酸が肝臓中又は血清中に蓄積する可能性や、肝臓又は回腸の胆汁酸輸送及び代謝遺伝子の転写が影響を受け、非臨床動物種でみられた肝胆道系の変化に関与する可能性かについて検討するため、マウス、ラット及びイヌのメカニズム試験を実施した。マウス（rasH2野生型、C57BL/6及び BALB/c）、ラット及びイヌの血漿中及び／又は肝臓中胆汁酸濃度及び、マウス（rasH2野生型、C57BL/6及び BALB/c）の肝臓又は回腸の胆汁酸輸送及び代謝遺伝子の転写量の変化について検討した。前述の評価の他に、rasH2野生型マウスにおいて、肝障害及び炎症性バイオマーカー［血清 miRNA 種（miR 122及び miR 192）、HMGB1、SAA 及び／又はサイトカイン］についても評価した。

2.6.6.A.8.3.2.1　rasH2野生型マウス（交雑系）の12週間の回復性期間を設けた12週間経口投与バイオマーカー探索試験（TT#[redacted]-6034）の採取試料に対する評価（TT#[redacted]-9693）

[資料4.2.3.7.3.3: TT#[redacted]-9693]

rasH2野生型マウス（交雑系）の12週間の回復性期間を設けた12週間経口投与バイオマーカー探索試験（TT#[redacted]-6034）[2.6.7.A.18A 項]にて剖検時に採取した血清、肝臓及び回腸を、本試験（TT#[redacted]-9693）[2.6.7.A.17 項]に用いた。本試験の目的は、被験物質に関連した以下のパラメータの変化を、メタボローム解析、遺伝子発現解析及びプロテオーム解析を用いて検出できるかどうかを検討することであった。

- 血清中及び肝臓中の胆汁酸
- 肝臓及び回腸における胆汁酸輸送及び代謝遺伝子発現の変化
- 血清中の miRNA 種（miR 122及び miR 192）、HMGB1及び SAA。miR 122、miR 192及び HMGB1は肝障害を示すバイオマーカーであり、SAA は全身性の炎症を示すバイオマーカーである。
- 炎症を示すサイトカインの血清中濃度

投薬に関連した変化として、500 mg/kg/日群で、血清中及び肝臓中のタウリン抱合胆汁酸の増加（血清：TCA が雄で最高39倍、雌で最高9倍、肝臓：TCA が雄でのみ最高2倍）、血清中総遊離型胆汁酸の増加（最高19倍）、及び肝臓の胆汁酸輸送及び代謝遺伝子［Akr1b7、Abcc4（Mrp4）、Abcc3（Mrp3）及び Slco1a1（Oatp1）］の転写量に増加又は減少がみられた。200 mg/kg/日群で、肝臓の胆汁酸輸送及び代謝遺伝子の Akr1b7及び Slco1a1（Oatp1）の転写量に変化がみられた。これらの変化は、Slco1a1（Oatp1）遺伝子を除き、本試験の投与期間全体を通じてみられ、用量に関連したが、概して投与期間に応じた変化の増大はみられなかった。500 mg/kg/日群で、SAA 及

Confidential

び特定のサイトカイン評価項目（GRO/KC 及び IL-6）の散発的な増加がみられ、投与期間を通してその発生率の増加及び変化の増大がみられたことから、投薬に関連した変化と考えられた。

12週間の回復期間終了時、血清中胆汁酸値を除き、評価を実施したすべてのパラメータに投薬に関連した変化はみられなかったことから、前述の変化は完全に回復性があることが示された。高用量群の雌における胆汁酸値も対照群の値にまで回復したが、高用量群の雄については、最高値からは低下したものの対照群と比較して高値が維持され、回復する傾向にとどまった。これは、投与期間中における血清胆汁酸の増加の程度が雄において最高であったことから考えると、想定内と考えられる。

胆汁酸の変化、胆汁酸輸送及び代謝遺伝子の転写量の変化、SAA の変化並びにサイトカインの変化について、作用が既知の種々の試験物質によるこれらのパラメータの変化に関する情報が少ないため、毒性学的意義は確かではない。しかし、胆汁酸の変化、並びに胆汁酸輸送及び代謝遺伝子の転写量の変化は、in vivo において胆汁酸トランスポーターを可逆的に阻害する可能性を示唆している。SAA 及びサイトカインは、血清の炎症性バイオマーカーであるが肝臓に対して特異的なものではないことから、rasH2野生型マウス（交雑系）の12週間回復期間を設けた12週間経口投与バイオマーカー探索試験（TT#[redacted]-6034）[2.6.7.A.18A 項]におけるグラゾプレビル投与による血清中 SAA 及びサイトカインの増加は、胆嚢又は小腸でみられた回復性の炎症に関連している可能性が考えられる。

2.6.6.A.8.3.2.2　C57BL/6マウス及び BALB/c マウスの1ヵ月間経口投与探索毒性試験（TT#[redacted]-6039）の採取試料に対する評価（TT#[redacted]-9709）

[資料4.2.3.7.3.4: TT#[redacted]-9709]

C57BL/6マウス及び BALB/c マウスの1ヵ月間経口投与探索毒性試験（TT#[redacted]-6039）[2.6.7.A.18B 項]にて剖検時に採取した血清及び肝臓を本試験（TT#[redacted]-9709）[2.6.7.A.17 項]で使用した。本試験の目的は、以下のパラメータの被験物質に関連した変化を、メタボローム解析、遺伝子発現解析及びプロテオーム解析を用いて検出できるかどうかを検討することであった。

- 血清中胆汁酸
- 胆汁酸輸送及び代謝遺伝子発現の変化
- 血清中の miRNA 種（miR 122及び miR 192）及び SAA。miR 122及び miR 192は肝障害を示すバイオマーカーであり、SAA は全身性の炎症を示すバイオマーカーである。

さらに、剖検時のグラゾプレビルの血清中及び肝臓中濃度も測定し、異なる系統で比較した。

500 mg/kg/日群で、複数の血清中タウリン抱合胆汁酸種の増加（TCA については C57BL/6マウス雌で5.5倍、C57BL/6マウス雄で3.3倍、BALB/c マウス雄で3倍）がみられた。さらに、両系統のほとんどの場合に雌雄で、Abcc3（Mrp 3）、Abcc4（Mrp 4）及び Akr1b7の増加、並びに Slco1a1（Oatp 1）の減少が、BALB/c マウスの雌雄で Cyp7a1の増加がみられた。200 mg/kg/日群の C57BL/6の雄及び BALB/c の雌雄で Akr1b7の増加が、BALB/c の雌雄で Cyp7a1の増加がみられた。さらに、BALB/c の雌で Slco1a1（Oatp1）の減少がみられた。

Confidential

剖検時の血清中及び肝臓中のグラゾプレビル濃度(雌雄合算値)を[表 2.6.6.A-42]に概要を示す。

表 2.6.6.A-42 剖検時の血清中及び肝臓中のグラゾプレビル濃度（平均±標準偏差）

Dose (mg/kg/day)	Mouse Strain	Serum (μM)	Liver (μM)	Liver/ Serum
200	C57BL/6	1.8 ± 1.8	143.0 ± 56.4	125.0 ± 72.6
500		55.0 ± 42.2	291.0 ± 89.0	18.4 ± 28.6
200	BALB/c	1.0 ± 0.9	116.2 ± 26.1	263.3 ± 215.4
500		3.7 ± 5.4	186.6 ± 81.0	167.7 ± 126.6

[Sec. 2.6.7.A.17]　Investigative Laboratory Sciences Study (TT#[redacted]-9709) on samples collected in the Exploratory One-Month Oral Toxicity Study in C57BL/6 and BALB/c Mice.　TT#[redacted]-6039

投与24時間後のグラゾプレビル濃度は血清より肝臓でより高く、500 mg/kg/日群の肝臓／血清濃度比は、C57BL/6マウスで約18.4、BALB/c マウスで168であった。

胆汁酸の変化、胆汁酸輸送及び代謝遺伝子の転写量の変化について、作用が既知の種々の試験物質によりこれらのパラメータの変化に関する情報が少ないことから、毒性学的意義は確かではない。しかし、C57BL/6及び BALB/c マウスにおいてグラゾプレビルが胆汁酸トランスポーターを in vivo で阻害する可能性が示唆された。

2.6.6.A.8.3.2.3　ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6014）の採取試料に対する評価（TT#[redacted]-9745）

[資料4.2.3.7.3.5: TT#[redacted]-9745]

ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6014）[2.6.7.A.7E 項]において、投与12週及び24週の投与24時間後に採取した血清のうち、血清生化学的検査に使用した血清の残りを本試験（TT#[redacted]-9745）[2.6.7.A.17 項]で使用した。本試験の目的は、媒体群及び高用量群（200 mg/kg b.i.d.）の血清を用いて、血清中胆汁酸の変化がメタボローム解析を用いて検出できるかどうかを検討し、前述の血清中胆汁酸蓄積を誘導するグラゾプレビルの胆管膜トランスポーターの阻害作用を評価することであった。

200 mg/kg b.i.d.群で血清中遊離型又は抱合胆汁酸に変化はみられなかった。よって、ラット（in vivo）において胆汁酸トランスポーターの阻害を示す証拠は認められなかった。

2.6.6.A.8.3.2.4　イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験（投与3ヵ月後の中間剖検を含む）（TT#[redacted]-6015）の採取した試料に対する評価（TT#[redacted]-9746）

[資料4.2.3.7.3.6: TT#[redacted]-9746]

イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験（投与3ヵ月後の中間剖検を含む）（TT#[redacted]-6015）[2.6.7.A.7G 項]において、投与3/4週、11週、26週及び38週の投与24時間後に採取した血清のうち、血清生化学的検査に使用した血清の残りを本試験（TT#[redacted]-9746）[2.6.7.A.17 項]で使用した。本試験の目的は、媒体群及び高用量群（300/100 mg/kg/日）の血清を用いて、血清中胆汁酸の変化がメタボローム解析を用いて検出できるかどうかを検討し、グラゾプレビルの胆管膜トランスポーターの阻害

Confidential

作用により血清中胆汁酸蓄積が観察される可能性を評価することであった。

300 mg/kg/日群で、投薬に関連して、総タウリン抱合胆汁酸（最高12倍、主な胆汁酸である TCA は最高13倍）及び総遊離型胆汁酸（最高7倍）が統計学的に有意に増加した（P≤0.05）。高用量群の投与量を100 mg/kg/日に減量後も、胆汁酸の統計学的に有意な増加（P≤0.05）は継続してみられたが、その程度は、総タウリン抱合胆汁酸の増加が最高5倍（TCA は最高6倍）、総遊離型胆汁酸の増加が最高5倍に低下した。

これらの胆汁酸の増加に関して、これらの評価項目に関する情報が少ないため、毒性学的意義は確かではない。しかし、本試験より、イヌ（in vivo）において胆汁酸トランスポーターが阻害される可能性が示唆された。

2.6.6.A.8.3.2.5　結論

胆汁酸［総タウリン抱合胆汁酸（主に量が最多である TCA）及び遊離型胆汁酸］の増加は、マウス（rasH2野生型、C57BL/6及び BALB/c）及びイヌでみられたが、ラットではみられなかった。マウス及びイヌでみられたこれらの胆汁酸増加は、一般的に血漿又は肝臓曝露量と関連しており、マウス及びイヌの曝露量は、ラットにおいて到達できた最大曝露量よりもおおむね高かったことが、ラットでは胆汁酸の増加がみられなかった理由と考えられる。さらに、試験を実施したマウスの全系統の肝臓において、胆汁酸の輸送及び代謝に関連した遺伝子発現の増減に変化がみられた。このような変化を引き起こす化合物の情報が十分に得られないため確定的ではないが、マウス及びイヌにおいて HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときよりも大幅に高い曝露量（rasH2野生型マウス及びイヌでそれぞれ約75倍及び約518倍）では in vivo で胆汁酸トランスポーターに作用することが示唆された。

非臨床動物種において、グラゾプレビル投与に関連した血清中胆汁酸の変化と肝臓変化（トランスアミナーゼ増加を含む）との間に関連がある可能性は低いと考えられる。血清中胆汁酸の増加を示したイヌにおいて、肝臓の炎症又は壊死、並びにトランスアミナーゼの増加はみられず、限局性肝壊死を示した BALB/c マウスの雌において、血清中胆汁酸の増加はみられなかった。

非臨床動物種において、グラゾプレビル投与に関連した血清中胆汁酸の変化と胆管所見の関連性、特に総／直接血清ビリルビンの顕著な増加と胆嚢又は胆管の病理組織学的変化との間の関連性があることを示す証拠は限られている。しかし、血清胆汁酸の変化を示した動物種であるマウス及びイヌは、胆嚢又は胆管の病理組織学的変化や総／直接血清ビリルビンの顕著な増加が観察された種でもあることから、この関連性は無視できない。ただし、マウス及びイヌでみられた胆管変化に関しては、反復投与毒性試験での NOAEL から算出した安全域が高い（rasH2野生型マウスで約37倍、CD1マウスで約185倍、イヌで約83倍）ことから、ヒトへの外挿性はないものと考えられた。

2.6.6.A.8.4　依存性試験

有色ラット及びアルビノラットに［^{14}C］グラゾプレビルの50 mg/kg を単回経口投与して定量的全身オートラジオグラフィー（Quantitative whole body autoradiography: QWBA）を実施した結果、

Confidential

グラゾプレビルは脳血液関門を容易に通過しないことが明らかとなった[2.6.4.A.4.1 項]。さらに、グラゾプレビルの薬理学的プロファイル（off-target プロファイルを含む[2.6.2.A.3.1.1 項]）から薬物乱用傾向を示す可能性はみられず、標準的な反復投与毒性試験において向精神作用（鎮静作用又は刺激作用）は認められなかった[2.6.6.A.3 項]。これより、動物を用いた依存性試験は実施しなかった。

2.6.6.A.8.5　代謝物に関する試験

ヒト血漿中に代謝物は検出されなかった[2.6.4.A.5.1.4 項]。これより、グラゾプレビルは、代謝物の安全性評価に関連する ICH M3 (R2)ガイダンスの要件に合致したため、個々の代謝物に関する試験は実施しなかった。さらに、ヒトで認められた代謝物はすべて、M11a/b（投与量の8.15%）及び M14（投与量の4.46%）を除き、ラットまたはイヌの排泄物中にもみられた[2.6.4.A.5.1 項]。これら代謝物 M11a/b はラットの胆汁中及び糞中にみられた代謝物 M4a 及び M4b の腸内細菌由来生成物、M14はラットの胆汁中及び糞中にみられた代謝物 M5の水酸化物であると考えられる。なお、腸内細菌由来生成物である M11a/b は、血漿中で検出されなかったことから、吸収されずに消化管で生成され排泄されると考えられる。

2.6.6.A.8.6　不純物に関する試験

個々の不純物に関する非臨床試験は実施しなかった。すべての不純物は、非臨床毒性試験の評価に用いたバッチに含まれていたことにより安全性が評価されたか[表 2.6.6.A-43]、原薬の不純物に関する ICH Q3A (R2)ガイドラインにて規定された安全性確認の必要な閾値を超えないものであった。さらに、ICH M7ガイドラインに従って不純物の潜在的変異原性についても評価した。変異原性不純物及びその管理については、3.2.S.3.2項（グラゾプレビル）を参照のこと。

Confidential

表 2.6.6.A-43 安全性の確認が必要なグラゾプレビル不純物及びそのヒト摂取量に対するラット摂取量比

Impurity	Specification Limits (%)	Impurity Level (%)[a]	Rat Total Daily Intake of Impurity (mg/kg)[b]	Human Total Daily Intake of Impurity (mg/kg)[c]	Dose Multiple based on (mg/kg)[d]	Rat Total Daily Intake of Impurity (mg/m^2)[e]	Human Total Daily Intake of Impurity (mg/m^2)[f]	Dose Multiple based on mg/m^2[g]
不純物A*	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	240	[redacted]	[redacted]	39
不純物B*	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	93	[redacted]	[redacted]	15

a Based on the nonclinical Batch/Lot #[redacted] used in the 1-month GLP toxicity study in rats (TT#[redacted]-1120) [Sec. 2.6.6.A.3.6].
Batch/Lot #[redacted] was also used in GLP genetic toxicology studies [Sec. 2.6.6.A.4].
b Rat total daily intake calculated based on a NOAEL of 400 mg/kg/day (given as 200 mg/kg b.i.d.) in the 1-month GLP toxicity study in rats (TT#[redacted]-1120) [Sec. 2.6.6.A.3.6].
c Based upon a total daily dose of grazoprevir of 100 mg and presuming a 60 kg patient.
d Dose multiple was calculated as a ratio of total daily intake in rats (mg/kg) divided by the total daily intake in humans (mg/kg).
e Based upon a mg/kg to mg/m^2 conversion factor of 6 for rat; *i.e.* mg/kg X 6 equals rat dose on basis of mg/m^2.
f Based upon a mg/kg to mg/m^2 conversion factor of 37 for an adult human; *i.e.* mg/kg X 37 equals adult human dose on basis of mg/m^2.
g Dose multiple was calculated as a ratio of total daily intake in rats (mg/m^2) divided by the total daily intake in humans (mg/m^2).

* 新薬承認情報提供時に置き換え

Confidential

2.6.6.A.8.7　その他の毒性試験

2.6.6.A.8.7.1　光毒性試験

グラゾプレビルは波長領域290～700 nm で光吸収を示し[3.2.S.3.1項（グラゾプレビル）]、モル吸光係数が1000 L/mol/cm を超えるため、雄性有色ラットの光毒性試験を実施した（TT#[redacted]-9002）[2.6.7.A.17 項]。グラゾプレビル［50 mg/kg/日、200 mg/kg b.i.d.（1日総投与量：400 mg/kg/日）］を雄性有色ラットに投与した結果、光毒性を示唆する皮膚反応及び眼所見はみられなかったため、グラゾプレビルが光毒性を有する可能性は低いと考えられた。さらに、有色ラット及びアルビノラットに［^{14}C］グラゾプレビルの50 mg/kg を単回経口投与して QWBA を実施した結果、日光に曝される組織（皮膚及び眼）へのグラゾプレビルの分布はわずかであり、組織／血漿中濃度比は低く、組織への滞留時間も短かった[2.6.5.A.4 項] [2.6.5.A.5 項]。

2.6.6.A.8.7.1.1　有色ラットの3日間経口投与光毒性及び生体試料分析試験（TT#[redacted]-9002）

[資料4.2.3.7.7.1: TT#[redacted]-9002]

本試験の目的は、雄性有色ラットにグラゾプレビルを3日間反復投与後、疑似太陽光を照射したときの光毒性を評価することであった（TT#[redacted]-9002）[2.6.7.A.17 項]。

雄性 Crl:LE(Long-Evans)ラットにグラゾプレビルの50 mg/kg/日（1日1回を3日間）並びに200 mg/kg［投与1及び2日に1日2回（b.i.d.）及び投与3日に1日1回］を経口投与した。最高用量は溶液での投与可能な最大用量であり、最大曝露量を得ることができる用量であった。投与3日の最終投与から約2時間後に、麻酔下ラットの眼及び皮膚（剃毛済み）に、最小紅斑線量の0.5倍に相当する量の紫外線照射（UVR）を30分間実施した。なお、光毒性を示唆する皮膚反応はみられなかったことから、剖検で皮膚の採取は行わず、眼球のみを採取して眼の病理組織学的検査を実施した。血漿中グラゾプレビル濃度を測定するため、同様にグラゾプレビルを投与した別の動物群より、投与3日の最終投与から1、2及び4時間後に採血した。

試験期間中に死亡はみられなかった。また、投薬に関連した一般状態の変化及び体重変化はみられなかった。

疑似太陽光の UVR 照射により、光毒性を示唆する皮膚反応はみられなかった。

眼科学的検査において、対照物質又はグラゾプレビルの経口投与に関連すると思われる所見は認められなかった。

眼の病理組織学的検査では、投薬に関連した変化は認められなかった。

血漿中濃度測定を実施したところ、対照群では定量下限未満であった。投薬群では、投与から1、2及び4時間後の血漿中濃度と、以前、同様の投与量及び測定時期にて実施したラット毒性試験における血漿中濃度と一致していた。以上より、グラゾプレビルの50 mg/kg/日（1日1回を3日間）並びに200 mg/kg［投与1及び2日に1日2回（b.i.d.）及び投与3日に1日1回］を経口投与し、最終投与終了時から約120分後に、疑似太陽光 UVR を照射しても、光毒性を示唆する皮膚反応及び眼所見はみられなかった。

Confidential

2.6.6.A.8.7.2　併用投与毒性試験

グラゾプレビル及びエルバスビルをそれぞれ単独投与したときの非臨床安全性試験の結果より、重複する毒性所見又はグラゾプレビル／エルバスビル併用に関して懸念すべき事項は特に認められなかった（B 項、エルバスビル参照）。よって、ICH M3 (R2)の「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に関する質疑応答集（Q&A）の「配合剤のための毒性試験」の質問9に従うと、グラゾプレビル／エルバスビル併用投与の非臨床毒性試験は必要でない。しかし、グラゾプレビル／エルバスビルの臨床プログラム開始時には、HCV に対する直接型抗ウイルス薬（DAA）の併用投与を担保するための非臨床安全性試験の実施が要求される規制的状況となることを考慮し、エルバスビル／グラゾプレビルを0/5、25/0及び25/5 mg/kg/日の用量で投与するイヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験を実施した。

グラゾプレビル、リバビリン及びソホスブビルの非臨床及び臨床経験より、HCV 感染患者に対してグラゾプレビルとリバビリン又はソホスブビルを併用投与することに懸念すべき事項は特に認められなかった[資料4.3: 6][資料4.3: 8][資料4.3: 7]。そこで、ICH M3 (R2)の「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に関する質疑応答集（Q&A）の「配合剤のための毒性試験」の質問9に従い、グラゾプレビル、リバビリン及びソホスブビルの非臨床併用投与毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.A.8.7.2.1　イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験（エルバスビル及びグラゾプレビルの併用）（TT#[redacted]-6051）

[資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051]

本試験の目的は、イヌに約1ヵ月間1日1回、エルバスビル及びグラゾプレビルを併用投与したときのエルバスビル及びグラゾプレビルの毒性及び TK プロファイルを評価することであった（TT#[redacted]-6051）[2.6.7.A.18C 項]。イヌは、グラゾプレビル及びエルバスビルのいずれの投与においても異なる標的臓器に病理組織学的変化がみられた動物種であったため、適切な動物種と考えられた。

ビーグル（各群雌雄各3匹）にエルバスビル（フリー体）／グラゾプレビル（カリウム塩）を0/0、25/0、0/5及び25/5 mg/kg/日の用量で経口投与した。媒体として、エルバスビルでは10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を、グラゾプレビルでは100% PEG 400を使用した。エルバスビル／グラゾプレビル各用量の投与方法は以下の通り。

- エルバスビル／グラゾプレビルの0/0 mg/kg/日群：
  カプセル（100% PEG 400のみ）投与後、10%ポリソルベート80水溶液を投与。
- エルバスビル／グラゾプレビルの0/5 mg/kg/日群：
  グラゾプレビルのカプセル投与後、10%ポリソルベート80水溶液を投与。
- エルバスビル／グラゾプレビルの25/0 mg/kg/日群：
  カプセル（100% PEG 400のみ）投与後、エルバスビル溶液を投与。
- エルバスビル／グラゾプレビルの25/5 mg/kg/日群：
  グラゾプレビルのカプセル投与後、エルバスビル溶液を投与。

Confidential

毒性評価は、死亡、一般状態、体重、摂餌量、心電図検査、眼科学的検査、臨床検査及び病理検査により実施した。投薬群及び対照群の血漿中及び肝臓ホモジネート中のエルバスビル及び／又はグラゾプレビルの濃度を測定した。

投与期間中、投薬に関連した死亡はみられなかった。

病理組織学的検査で認められた唯一の変化は、エルバスビル／グラゾプレビルの25/5及び25/0 mg/kg/日群の雌のみにおけるリンパ節並びに小腸（パイエル板）あるいは大腸の消化管関連リンパ系組織における空胞化であり、エルバスビル投与に関連したものであった。これらエルバスビル投与に関連したリンパ組織における空胞化は組織学的にリン脂質症に一致したものであり、エルバスビル単剤を用いて実施したイヌの毒性試験において既に認められていた所見であった。本所見は、その程度が軽度であること（TT#[redacted]-1031）[2.6.7.B.17A 項]、リンパ組織に他の影響（すなわちリンパ様細胞の減少）がみられないこと及び血液学的検査で投薬に関連した変化が認められていないこと[2.6.6.B.3項　反復投与毒性試験]から、その毒性学的意義は低いと考えられた。さらに、エルバスビル投与に関連したリン脂質症は、イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験（3ヶ月間休薬期間）（TT#[redacted]-1031）[2.6.7.B.17A 項]で回復性があることが示された。エルバスビルとグラゾプレビルを併用投与しても、毒性学的に意義のある病理学的検査結果の差異は認められなかった。

エルバスビル及びグラゾプレビルの TK パラメータ及び肝臓中濃度を[表 2.6.6.A-44]、[表 2.6.6.A-45]、[表 2.6.6.A-46]、[表 2.6.6.A-47]、[表 2.6.6.A-48]、及び[表 2.6.6.A-49]に示す。

表 2.6.6.A-44 イヌにグラゾプレビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 1 日）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5[a]	Female	40.4 ± 9.21	6.14 ± 1.10	2.7 ± 0.67
	Male	34.4 ± ID	6.79 ± ID	2.0 ± ID
	All	38.9 ± 6.68	6.30 ± 0.794	2.5 ± 0.50
5/25[b]	Female	63.4 ± 36.8	5.82 ± 3.66	5.3 ± 1.3
	Male	53.3 ± 16.4	5.42 ± 2.02	5.3 ± 1.3
	All	58.4 ± 18.1	5.62 ± 1.87	5.3 ± 0.84

ID = Insufficient Data
[a] MK-5172: 5 mg/kg/day
[b] MK-5172/ MK-8742: 5/ 25 mg/kg/day
MK-5172 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.013 μM) of the bioanalytical method.
MK-5172 = Grazoprevir.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec. 2.6.7.A.18C]　One-Month Oral Combination Toxicity Study in Dogs.　TT#[redacted]-6051

Confidential

表 2.6.6.A-45 イヌにエルバスビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 1 日）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5/25[a]	Female	10.7 ± 3.40	0.742 ± 0.205	5.3 ± 1.3
	Male	8.65 ± 0.407	0.606 ± 0.0659	3.3 ± 0.67
	All	9.70 ± 1.60	0.674 ± 0.101	4.3 ± 0.80
25[b]	Female	13.9 ± 4.61	0.886 ± 0.356	5.3 ± 1.3
	Male	7.19 ± 2.76	0.563 ± 0.0556	3.3 ± 0.67
	All	10.5 ± 2.83	0.725 ± 0.177	4.3 ± 0.80

[a] MK-5172/ MK-8742: 5/ 25 mg/kg/day
[b] MK-8742: 25 mg/kg/day
MK-8742 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM) of the bioanalytical method.
MK-5172 = Grazoprevir.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec. 2.6.7.A.18C]　One-Month Oral Combination Toxicity Study in Dogs.　TT#[redacted]-6051

表 2.6.6.A-46 イヌにグラゾプレビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 5 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5[a]	Female	35.4 ± 12.2	7.54 ± 3.18	2.3 ± 0.88
	Male	25.2 ± 2.43	4.80 ± 0.287	2.0 ± 0.0
	All	30.3 ± 6.01	6.17 ± 1.55	2.2 ± 0.40
5/25[b]	Female	71.1 ± 32.7	7.14 ± 3.43	2.7 ± 0.67
	Male	49.3 ± 2.24	6.10 ± 2.07	4.7 ± 1.8
	All	60.2 ± 15.4	6.62 ± 1.81	3.7 ± 0.95

[a] MK-5172: 5 mg/kg/day
[b] MK-5172/ MK-8742: 5/ 25 mg/kg/day
MK-5172 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.013 μM) of the bioanalytical method.
MK-5172 = Grazoprevir.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec. 2.6.7.A.18C]　One-Month Oral Combination Toxicity Study in Dogs.　TT#[redacted]-6051

Confidential

表 2.6.6.A-47 イヌにエルバスビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 5 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5/25[a]	Female	9.87 ± 3.27	0.890 ± 0.289	3.3 ± 0.67
	Male	5.66 ± 0.566	0.471 ± 0.0349	3.0 ± 1.0
	All	7.76 ± 1.76	0.680 ± 0.160	3.2 ± 0.54
25[b]	Female	14.7 ± 3.67	1.36 ± 0.133	3.3 ± 0.67
	Male	4.48 ± 1.15	0.522 ± 0.0553	2.7 ± 0.67
	All	9.59 ± 2.86	0.943 ± 0.199	3.0 ± 0.45

[a] MK-5172/ MK-8742: 5/ 25 mg/kg/day
[b] MK-8742: 25 mg/kg/day
MK-8742 concentration in plasma from one control animal was above the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM) at 2 hours postdose. This value was less than 4% of the mean C_{max} of the 5/25 mg/kg/day (MK-5172/MK-8742) dose group.
MK-5172 = Grazoprevir.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec. 2.6.7.A.18C]　One-Month Oral Combination Toxicity Study in Dogs.　TT#[redacted]-6051

表 2.6.6.A-48 イヌにグラゾプレビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の肝臓中グラゾプレビル濃度（μM）c（平均±標準誤差）（投与 5 週）

Dose (mg/kg/day)	Time (hr) Necropsy
Vehicle	0.00 ± 0.00
5[a]	6.20 ± 1.51
5/25[b]	11.7 ± 2.50

[a] MK-5172: 5 mg/kg/day
[b] MK-5172/ MK-8742: 5/ 25 mg/kg/day
[c] Assuming a liver density of 1.0 g/mL
MK-5172 concentrations in liver from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.104 μM) of the bioanalytical method.
MK-5172 = Grazoprevir.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec. 2.6.7.A.18C]　One-Month Oral Combination Toxicity Study in Dogs.
TT#[redacted]-6051

Confidential

表 2.6.6.A-49 イヌにエルバスビル又はグラゾプレビル／エルバスビルを経口投与後の肝臓中エルバスビル濃度（μM）[c]（平均±標準誤差）（投与 5 週）

Dose (mg/kg/day)	Time (hr) Necropsy
Vehicle	0.00 ± 0.00
5/25[a]	6.32 ± 2.00
25[b]	6.05 ± 1.32

[a] MK-5172/ MK-8742: 5/ 25 mg/kg/day
[b] MK-8742: 25 mg/kg/day
[c] Assuming a liver density of 1.0 g/mL
MK-8742 concentrations in liver from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.227 μM) of the bioanalytical method.
MK-5172 = Grazoprevir.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec. 2.6.7.A.18C]　One-Month Oral Combination Toxicity Study in Dogs.
TT#[redacted]-6051

投与1日及び投与5週のグラゾプレビルに関して、個体間におけるばらつきを考慮すると、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値及び C_{max} 平均値に性差は認められなかった。両測定日とも、グラゾプレビルの全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値は、エルバスビル投与の有無に関わらず類似していた。平均肝臓中濃度はエルバスビル投与の有無に関わらず類似していた。対照群のすべての動物において、血漿中（投与1日及び投与5週）及び肝臓中（投与5週）のグラゾプレビル濃度は、生体試料中薬物濃度分析にて LLQ 未満（血漿：LLQ＝0.013 μM、肝臓：LLQ＝0.104 μM）であった。

投与1日及び投与5週のエルバスビルに関して、個体間におけるばらつきを考慮すると、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値及び C_{max} 平均値に性差は認められなかった。両測定日とも、全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値は、グラゾプレビル投与の有無に関わらず類似していた。平均肝臓中濃度は、グラゾプレビル投与の有無に関わらず類似していた。対照群のすべての動物において、血漿中（投与1日）及び肝臓中（投与5週）のエルバスビル濃度は、生体試料中薬物濃度分析にて LLQ 未満（血漿：LLQ＝0.023 μM、肝臓：LLQ＝0.227 μM）であった。投与5週に、対照群の1例で、血漿中エルバスビル濃度が投与2時間後に LLQ を超えた。この値は、5/25 mg/kg/日（グラゾプレビル／エルバスビル）群の C_{max} 平均値の4%未満であった。投薬群でみられた高い血漿中濃度と比較して、本対照群でみられた血漿中濃度は低値であったことから、本所見は本 TK 評価及び毒性評価の妥当性及び信頼性に影響を与えないと判断した。

以上の結果から、エルバスビル／グラゾプレビルを併用投与したときの NOEL は25/5 mg/kg/日未満であった。併用投与群で認められた所見はエルバスビル投与によるものであった。エルバスビルとグラゾプレビルとを併用投与しても、毒性学的に意義のある差異は認められなかった。さらに、本試験でみられた変化は、各薬剤の単独投与時の変化と一致しており、その毒性学的意義は低いと考えられた。よって、エルバスビル／グラゾプレビルを併用投与したときの NOAEL は、25/5 mg/kg/日であった。

Confidential

2.6.6.A.8.7.3　その他の試験

2.6.6.A.8.7.3.1　サルの8日間経口投与忍容性試験（TT#[redacted]-1059）

[資料4.2.3.7.7.3: TT#[redacted]-1059]

アカゲザル（雌雄各1匹）にグラゾプレビルの10 mg/kg/日を7日間経口投与した。媒体は100% PEG 400とした。本試験は、HCV に感染したチンパンジーを用いた薬理試験の用量検討試験として実施した（TT#[redacted]-1059）[2.6.7.A.17 項]。

忍容性の評価は、死亡、一般状態及び臨床検査により実施し、血漿中薬物濃度の測定も実施した。検査終了後、サルは動物コロニーに戻した。

被験物質の忍容性は良好であった。投薬に関連した変化はみられなかった。

PK パラメータを[表 2.6.6.A-50]に示す。

表 2.6.6.A-50 サルにグラゾプレビルを経口投与後の血漿中グラゾプレビルの PK パラメータ（投与 7 日）

	Grazoprevir (10 mg/kg/day)	
	Female (#07-0179)	Male (#08-0010)
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	0.61	0.70
C_{max} (μM)	0.15	0.23
T_{max} (hr)	2.0	2.0

[Sec. 2.6.7.A.17]　Exploratory 8-Day Oral Tolerability Study in Rhesus Monkeys.　TT#[redacted]-1059

2.6.6.A.8.7.3.2　グラゾプレビル静脈内投与用製剤の in vitro 溶血性試験（TT#[redacted]-7867）

[資料4.2.3.7.7.4: TT#[redacted]-7867]

ヒトの ADME 試験のために、グラゾプレビルの静脈内投与用製剤について溶血性試験を実施した（TT#[redacted]-7867）[2.6.7.A.17 項]。グラゾプレビル静脈内投与用製剤（0.107 mg/mL のグラゾプレビル、媒体として5 mM のトリス緩衝液中に20%（w/v）Captisol®及び5%（w/v）PEG 400を含有）及びその媒体（プラセボ）について、ヒト全血を用いて in vitro 溶血性を評価した。

生理食塩液で希釈したプラセボについて、すべての希釈液（1：512～1：1）でヒトの全血に対して溶血性は認められなかった。プラセボで希釈したグラゾプレビル静脈内投与用製剤について、すべての濃度（0.00002～0.0107 mg/mL）でヒトの全血に対して溶血性は認められなかった。以上の結果から、本試験で用いたグラゾプレビル静脈内投与用製剤は、ヒト全血に対して本試験で実施したすべての濃度において溶血性はないと考えられた。

Confidential

2.6.6.B　B 項：エルバスビル

2.6.6.B.2　単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施していないが、エルバスビルをマウスに最大1000 mg/kg/日まで、ラットに最大1000 mg/kg b.i.d.まで、及びイヌに最大1000 mg/kg/日まで投与した反復投与毒性試験内で、ICH M3 (R2)ガイダンスに従って単回投与後に急性毒性を評価した。いずれの動物種においても、急性毒性を示唆する変化はみられなかった[2.6.6.B.3 項]。

rasH2野生型マウスでは、最大1000 mg/kg/日までの初回投与後、死亡は認められず、急性毒性を示唆する変化はみられなかったことから、概略の致死量は1000 mg/kg 超であった[2.6.6.B.3.1 項]。ラットでは最大1000 mg/kg b.i.d.（1日投与量は2000 mg/kg）の初回投与後、死亡は認められず、急性毒性を示唆する変化はみられなかったことから、概略の致死量は1000 mg/kg b.i.d.超であった[2.6.6.B.3.3 項]。イヌでは最大1000 mg/kg/日までの初回投与後、死亡は認められず、認められた所見は1000 mg/kg 群での嘔吐及び糞便の白色／薄茶色化（吸収されずに糞便中に排泄された被験物質に起因すると考えられた）に限定されており、概略の致死量は1000 mg/kg 超であった[2.6.6.B.3.8 項]、[2.6.6.B.3.9 項]。

2.6.6.B.3　反復投与毒性試験

ラットで最大6ヵ月間及びイヌで最大9ヵ月間の反復投与毒性試験を実施し、エルバスビルの毒性を検討した。さらに、実施する可能性のあった短期がん原性試験の用量を設定するため、rasH2野生型マウスの1ヵ月間用量設定試験を実施した。最高用量は、多くの試験で ICH M3 (R2)ガイダンスに従って、限界量である1000 mg/kg/日とした。特記しない限り、通常の生前検査パラメータ（一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査及び臨床病理検査、イヌのみ心電図検査を含む）及び病理検査パラメータ（全身の種々の組織についての臓器重量、肉眼検査、病理組織学的検査）を評価した。マウスの用量設定試験、並びにラット及びイヌの重要な試験についての概要を[表2.6.6.B-1]に示す。

Confidential

表 2.6.6.B-1　エルバスビルのマウス、ラット及びイヌにおける反復経口投与毒性試験

Study	Species/Sex	Duration of Treatment	Doses Evaluated (mg/kg/day)	Formulation
TT#[redacted]-6047	Mouse[a]/F&M	1 month	0, 10, 50, 300, 1000[b]	10% PS80
TT#[redacted]-2901	Rat/M	7 days	0, 10, 100, 750	10% PS80
TT#[redacted]-6014[c]	Rat/F&M	14 days	0, 100, 300, 1000 b.i.d.	10% PS80
TT#[redacted]-6024	Rat/F&M	3 months	0, 50, 300, 1000[b]	10% PS80
TT#[redacted]-6033	Rat/F&M	6 months	0, 30, 300, 1000[b]	10% PS80
TT#[redacted]-6013	Dog/F&M	14 days	25	10% PS80
TT#[redacted]-6025	Dog/F&M	3 months	0, 2, 25, 1000[b]	10% PS80
TT#[redacted]-6030	Dog/F&M	9 months	0, 5, 25, 1000[b]	10% PS80

a　rasH2 wild-type Mouse.
b　High dose = Limit dose according to ICH M3 (R2) guidance.
c　Due to a sample preparation problem, samples from the 100-mg/kg/day dose group could not be analyzed and data were generated in a subsequent study (TT#[redacted]-6017) [Sec. 2.6.6.B.3.4].
b.i.d. = Bis in die.
F = Female.
M = Male.
10% PS80 = 10%· (w/w) polysorbate 80 in deionized water.

[Sec. 2.6.7.B.6; 2.6.7.B.6; 2.6.7.B.7A; 2.6.7.B.7C; 2.6.7.B.7D; 2.6.7.B.7E; 2.6.7.B.7F; 2.6.7.B.7G]

2.6.6.B.3.1　rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験及びトキシコキネティクス試験（TT#[redacted]-6047）

[資料4.2.3.2.11: TT#[redacted]-6047]

本試験の目的は、エルバスビルを rasH2野生型マウスに約1ヵ月間1日1回経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを評価し、実施する可能性のあったマウスの短期がん原性試験に使用する投与量を検討することであった（TT#[redacted]-6047）[2.6.7.B.6 項]。

Jic : CB6F1-nonTgrasH2@Jcl マウスを、毒性評価用として対照群を含む5群（各群雌雄各10匹）、TK 測定用として対照群（雌雄各5匹）及び被験物質を投与する4群（各群雌雄各11匹）に割り付け、各群にエルバスビルの0（対照群）、10、50、300及び1000 mg/kg/日を約1ヵ月間経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体を投与した。最高用量は、ICH M3 (R2)ガイダンスに従って、限界量である1000 mg/kg/日とした。

試験期間中に死亡はみられず、投薬に関連した変化もみられなかった。

エルバスビルの TK パラメータ及び肝臓中濃度測定の結果を[表 2.6.6.B-2]及び[表 2.6.6.B-3]に示す。

Confidential

表 2.6.6.B-2　マウスにエルバスビルを経口投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 4 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
10	Female	2.33 ± 0.367	0.442 ± 0.0832	1.0 ± NC
	Male	3.47 ± 0.181	0.588 ± 0.0520	1.0 ± NC
	All	2.90 ± 0.301	0.515 ± 0.0547	1.0 ± NC
50	Female	13.6 ± 0.725	3.23 ± 0.186	1.0 ± NC
	Male	21.1 ± 0.828	3.59 ± 0.192	2.0 ± NC
	All	17.4 ± 1.25	3.34 ± 0.145	2.0 ± NC
300	Female	68.3 ± 14.6	6.76 ± 0.507	2.0 ± NC
	Male	76.0 ± 8.05	7.36 ± 0.197	4.0 ± NC
	All	72.1 ± 7.64	6.60 ± 0.320	2.0 ± NC
1000	Female	120 ± 13.9	9.62 ± 0.604	2.0 ± NC
	Male	182 ± 16.3	11.0 ± 1.21	4.0 ± NC
	All	151 ± 15.1	9.17 ± 1.12	4.0 ± NC

NC = Not Calculated
[Sec. 2.6.7.B.6]　One-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in rasH2 Wild-Type Mice. TT#[redacted]-6047

表 2.6.6.B-3　マウスにエルバスビルを経口投与後の肝臓中エルバスビル濃度（μM）[a]（雌雄合算平均±標準誤差）（投与 4 週）

Dose (mg/kg/day)	Time (hr)		
	4	8	24
10	2.38 ± 0.336	1.01 ± 0.292	0.00 ± 0.00
50	9.08 ± 1.26	4.21 ± 0.823	0.00 ± 0.00
300	40.0 ± 5.15	27.4 ± 4.22	0.928 ± 0.133
1000	59.1 ± 9.10	46.5 ± 5.19	20.9 ± 8.00

[a] Assuming a liver density of 1.0 g/mL.
[Sec. 2.6.7.B.6]　One-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in rasH2 Wild-Type Mice.　TT#[redacted]-6047

すべての投与群において、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値に性差はみられなかった。全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、10～50 mg/kg/日の用量範囲ではほぼ用量に比例し、50～1000 mg/kg/日の用量範囲では用量比を下回った。マウス肝細胞を用いた in vitro での代謝試験では、代謝物 m2のみが検出された[2.6.4.B.5.2 項]。

概して、投与4、8及び24時間後の平均肝臓中濃度に性差はみられなかったが、1000 mg/kg/日群の投与24時間後の濃度が、雄で雌と比べて約11.5倍高かった（雄は消失速度が遅いため、投与24時間後の血漿中濃度も雌に比べて約21倍高く、これに相関した）。平均肝臓中濃度は用量の増加に伴って増加した。

投薬に関連した変化がみられなかったことから、NOEL は1000 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝151 ±15.1 μM·hr）以上であった。

2.6.6.B.3.2　雄性ラットの7日間経口投与忍容性試験（TT#[redacted]-2901）

[資料4.2.3.2.12: TT#[redacted]-2901]

本試験の目的は、エルバスビルをラットに7日間1日1回経口投与したときの毒性及び TK プロフ

Confidential

ァイルを評価し、反復投与毒性試験に使用する投与量を検討することであった（TT#[redacted]-2901）[2.6.7.B.6 項]。

Crl:WI（Han）ラット（各群雄5匹）にエルバスビルの0（対照群）、10、100及び750 mg/kg/日を7日間経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体を投与した。

毒性評価は、死亡、一般状態、体重、臨床検査及び項目を限定した解剖・病理組織学的検査（肝重量、並びに、胃、小腸、大腸、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓、骨髄、骨格筋及び脳の剖検・病理組織学的検査）により実施した。エルバスビルの血漿中濃度も測定した。

投薬に関連した変化はみられなかった。

エルバスビルの TK パラメータを[表 2.6.6.B-4]に示す。

表 2.6.6.B-4　雄性ラットにおける血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均）（投与 7 日）

	Elbasvir (mg/kg/day)		
	Males		
	10	100	750
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	0.280 ± 0.226	6.71 ± 3.81	15.9 ± 3.62
C_{max} (μM)	0.0415 ± 0.0226	0.944 ± 0.525	1.14 ± 0.131
T_{max} (hr)	3.60 ± 0.894	3.20 ± 1.10	4.75 ± 1.50
Data presented as the mean ± standard deviation, n=5 for 10 and 100 mg/kg/day, n=4 for 750 mg/kg/day.			

[Sec. 2.6.7.B.6]　Exploratory 7-Day Tolerability Study in Male Rats.　TT#[redacted]-2901

全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、10～100 mg/kg/日の用量範囲では用量比を上回り、100～750 mg/kg/日の用量範囲では用量比を下回った。

投薬に関連した変化がみられなかったことから、NOEL は750 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝15.9 ±3.62μM·hr）以上であった。

2.6.6.B.3.3　ラットの14日間経口投与毒性試験（小核試験及び機能観察総合評価を含む）（TT#[redacted]-6014）

[資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014]

Crl:WI（Han）ラット（各群雌雄各10匹）にエルバスビルの0（対照群）、100及び300 mg/kg/日あるいは1000 mg/kg b.i.d.（1日総投与量は2000 mg/kg）を経口投与した（TT#[redacted]-6014）[2.6.7.B.7A 項]。媒体として100及び300 mg/kg/日群では10%（w/w）の、対照群及び1000 mg/kg b.i.d.群では5%（w/w）のポリソルベート80水溶液を使用した。最高用量は、限界量［ICH M3 (R2)ガイダンスに準拠］である1000 mg/kg を1日2回投与することで、エルバスビルの全身曝露を最大に得られるように設定した。

通常の評価項目に加え、雄ラットにおいて初回投与後に FOB を実施し、雌雄ラットにおいて小核試験を実施し、すべての投与群においてエルバスビルの血漿中及び肝臓中濃度を測定した。

投薬に関連した変化が、1000 mg/kg b.i.d.群の雌雄及び300 mg/kg/日群の雄でみられた。1000 mg/kg b.i.d.群では、雌雄で糞便の白色化（おそらく未吸収の被験物質の排泄）及び摂餌量の

Confidential

減少（一過性）を伴う体重増加量の減少（雌で-19%、雄で-25%）が、雌で好中球の軽度増加（+60%）が、雄で血清コレステロールのごく軽度増加（+36%）がみられた。300 mg/kg/日群では、雄で体重増加量の減少（-14%）及び好中球の軽度増加（+71%）のみが認められた。全体として、これらの所見の程度は軽度であり、病理組織学的検査で関連する所見はみられなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

病理検査では、投薬に関連した変化はみられなかった。

FOB では、投薬に関連した変化はみられなかった。

小核試験の結果は陰性であった。

エルバスビルの TK パラメータ及び肝臓中濃度測定の結果を[表 2.6.6.B-5]及び[表 2.6.6.B-6]に示す。

表 2.6.6.B-5　ラットにエルバスビルを経口投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 2 週）

Dose (mg/kg/day)[a]	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
300	Female	7.84 ± 0.894	0.862 ± 0.0628	4.0 ± NC
	Male	14.3 ± 0.903	1.28 ± 0.159	6.0 ± NC
	All	11.1 ± 1.21	1.02 ± 0.0942	4.0 ± NC
1000 (b.i.d.)[b]	Female	15.5 ± 0.992	1.07 ± 0.0906	8.0 ± NC
	Male	27.0 ± 1.66	1.96 ± 0.121	8.0 ± NC
	All	21.3 ± 2.15	1.52 ± 0.209	8.0 ± NC

[a] MK-8742 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (0.023 μM) at all timepoints.
NC = Not Calculated
[b] 6 hours apart (+/- 15 minutes)
Due to a sample preparation problem, samples from the 100-mg/kg/day dose group could not be analyzed and data will be generated in a subsequent study.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec. 2.6.7.B.7A]　Fourteen-Day Oral Toxicity Study in Rats with Micronucleus and Functional Observational Battery Assays.　TT#[redacted]-6014

表 2.6.6.B-6　ラットにエルバスビルを経口投与後の肝臓中エルバスビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）（投与 3 週、剖検時）

Dose (mg/kg/day)[b]	Female	Male
100	1.74 ± 1.02	1.92 ± 0.537
300	2.74 ± 1.14	2.91 ± 0.701
1000 (b.i.d.)[c]	6.35 ± 1.36	11.0 ± 2.33

[a] Assuming a liver density of 1.0 g/mL..
[b] MK-8742 liver concentrations from all control animals were below the lower limit of quantitation (0.208-0.284 μM).
[c] 6 hours apart (+/- 15 minutes).
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec. 2.6.7.B.7A]　Fourteen-Day Oral Toxicity Study in Rats with Micronucleus and Functional Observational Battery Assays.　TT#[redacted]-6014

血漿検体操作において問題が生じたため、100 mg/kg/日群の血漿中濃度を分析できなかった。100 mg/kg/日群の TK データについては、以降の試験（TT#[redacted]-6017）[2.6.7.B.7B 項]で測定した。

Confidential

300 mg/kg/日群及び1000 mg/kg b.i.d.群の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値に性差はみられなかった。全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値の増加率は300 mg/kg/日～1000 mg/kg b.i.d.の用量範囲で用量比を下回った。

平均肝臓中エルバスビル濃度の増加率は、100 mg/kg/日～1000 mg/kg b.i.d.の用量範囲で用量比を下回った。

以上の結果より、NOEL は雌で300 mg/kg/日、雄で100 mg/kg/日であったが、本試験でみられた投薬に関連したすべての変化は毒性学的意義が低いと考えられたことから、NOAEL は1000 mg/kg の1日2回投与（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$＝21.3 ± 2.15 μM·hr）であった。

2.6.6.B.3.4　ラットの15日間経口投与トキシコキネティクス試験（TT#[redacted]-6017）

[資料4.2.3.2.14: TT#[redacted]-6017]

本試験の目的は、エルバスビルの100 mg/kg/日をラットに約2週間経口投与したときの TK プロファイルを評価することであった（TT#[redacted]-6017）[2.6.7.B.7B 項]。本試験は、ラットの14日間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6014）[2.6.7.B.7A 項]で血漿検体操作において問題が生じ、100 mg/kg/日群の血漿中濃度を分析できなかったために実施した。

Crl:WI（Han）ラット（雌雄各5匹）にエルバスビルの100 mg/kg/日を約2週間経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用した。

試験期間中、毎日死亡の有無を確認し、体重は投与容量の算出のみに用いた。試験3週にすべての動物の血漿中薬物濃度を測定した。

試験期間中に死亡はみられなかった。

TK パラメータを[表 2.6.6.B-7]に示す。

表 2.6.6.B-7　ラットにエルバスビルの 100 mg/kg/日を経口投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 3 週）

Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
Female	4.91 ± 0.600	0.598 ± 0.0258	1.8 ± 0.20
Male	8.85 ± 0.493	0.751 ± 0.0221	4.0 ± 0.63
All	6.88 ± 0.752	0.674 ± 0.0302	2.9 ± 0.48

[Sec. 2.6.7.B.7B]　Fifteen-Day Oral Toxicokinetic Study in Rats.　TT#[redacted]-6017

100 mg/kg/日投与時の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値に性差はみられなかった。ラットの14日間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6014）[2.6.7.B.7A 項]で得られた300 mg/kg/日群及び1000 mg/kg b.i.d.群の TK パラメータを参照すると、全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、100 mg/kg/日～1000　mg/kg b.i.d.の用量範囲で用量比を下回った。

Confidential

2.6.6.B.3.5　ラットの3ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6024）

[資料4.2.3.2.15: TT#[redacted]-6024]

Crl:WI（Han）ラット（各群雌雄各10例）に、エルバスビルの0（対照群）、50、300又は1000 mg/kg/日を経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体を投与した（TT#[redacted]-6024）[2.6.7.B.7C 項]。最高用量は、ICH M3 (R2)ガイダンスに従った限界用量である。

通常の評価項目に加え、被験物質投与群及び対照群の血漿中及び肝臓ホモジネート中エルバスビル濃度を測定した。

投薬に関連した所見は、300 mg/kg/日以上の雌及びすべての用量群の雄において認められた、一過性の投与後の流涎のみであった。投与直後に認められたこの変化の程度はごく軽度であり、かつ一過性であることから、本化合物が中枢を介して及ぼした影響ではなく、嗜好上の理由によるものと考えられ、毒性学的意義は低いと考えられた。

肉眼検査、臓器重量又は病理組織学的検査で投薬に関連した変化はみられなかった。

血漿中エルバスビルの平均 TK パラメータ及び肝臓ホモジネート中のエルバスビル濃度を、[表 2.6.6.B-8]及び[表 2.6.6.B-9]に示す。

表 2.6.6.B-8　ラットにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）:（投与 13 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
50	Female	2.75 ± 0.231	0.416 ± 0.0411	2.0 ± NC
	Male	5.96 ± 0.530	0.584 ± 0.0353	2.0 ± NC
	All	4.36 ± 0.608	0.500 ± 0.0404	2.0 ± NC
300	Female	8.64 ± 0.834	0.965 ± 0.116	4.0 ± NC
	Male	11.5 ± 1.15	0.916 ± 0.0567	4.0 ± NC
	All	10.4 ± 0.975	0.940 ± 0.0587	4.0 ± NC
1000	Female	15.1 ± 1.02	1.10 ± 0.0772	4.0 ± NC
	Male	19.5 ± 1.21	1.37 ± 0.0949	8.0 ± NC
	All	17.3 ± 1.23	1.14 ± 0.114	8.0 ± NC

NC = Not Calculated
MK-8742 concentrations in plasma from all control group animals at 4 hours postdose were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM).
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7C]　Three-Month Oral Toxicity Study in Rats.TT#[redacted]-6024

Confidential

表 2.6.6.B-9　ラットにエルバスビルを投与後の肝臓エルバスビル濃度（μM）[a]
（平均±標準誤差）:（投与 14 週、剖検時）

Dose (mg/kg/day)[b]	Female	Male
50	1.15 ± 0.542	1.31 ± 0.253
300	4.00 ± 1.06	5.69 ± 1.28
1000	6.05 ± 1.77	7.71 ± 1.99

[a] Assuming a liver density of 1.0 g/mL.
[b] MK-8742 liver concentrations from all control animals were below the lower limit of quantitation (0.226 μM).
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7C]　Three-Month Oral Toxicity Study in Rats.TT#[redacted]-6024

全投与群において、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値に顕著な性差はおおむねみられなかった。全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値はすべての用量間で用量比を下回る上昇を示した。平均エルバスビル肝臓中濃度は全投与群において雌雄で類似し、用量とともに上昇した。

さらに、ラットの14日間経口投与毒性試験で1000 mg/kg b.i.d.投与（TT#[redacted]-6014）[2.6.7.B.7A 項]と今回のラットの3ヵ月経口投与毒性試験における1000 mg/kg/日投与で同程度の曝露量が認められたことから、1000 mg/kg の1日1回投与と1000 mg/kg の1日2回（b.i.d.）投与では、全身曝露量及び C_{max} について実際には差はみられなかった。1000 mg/kg b.i.d.群で糞便の白色化がみられ、未吸収の被験物質の糞便中への排泄が示唆されたことからも、エルバスビルの経口バイオアベイラビリティには上限があると考えられた。

300 mg/kg/日以上を投与した雌及び全投与群の雄において、投与後に一過性の流涎がみられたことから、NOEL は雌で50 mg/kg/日、雄で50 mg/kg/日未満であった。流涎の毒性学的意義は低いと考えられたことから、NOAEL は1000 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 17.3 ± 1.23 μM·hr）であった。

2.6.6.B.3.6　ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6033）

[資料4.2.3.2.16: TT#[redacted]-6033]

Crl:WI（Han）ラット（各群雌雄各15例）に、エルバスビルの0（対照群）、30、300又は1000 mg/kg/日を約6ヵ月間経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体を投与した（TT#[redacted]-6033）[2.6.7.B.7D 項]。最高用量は、ICH M3 (R2)ガイダンスに従った限界用量である。

通常の評価項目に加え、被験物質投与群及び対照群の血漿中及び肝臓ホモジネート中エルバスビル濃度を測定した。

投薬に関連した死亡はみられなかった。

すべての用量群で投薬に関連した変化が認められた。30 mg/kg/日以上を投与した雌雄では流涎、及び対照に比べてごく軽度～軽度の（用量には関連しない）尿量の増加（最大+71%）がみられ、尿量の増加はおおむね尿比重のごく軽微な減少（最大-1.2%）を伴っていた。さらに300 mg/kg/日以上の雄では、ときに摂餌量の減少を伴う、投薬に関連した体重増加量の減少（1000 mg/kg/日で最大-17%）が認められたが、動物の一般状態に影響はなかった。これら所見の性質、及び関連する病理組織学的変化を認めなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

Confidential

臓器重量、肉眼検査又は病理組織学的所見について、投薬に関連した変化はみられなかった。

血漿中濃度における TK パラメータ及び平均肝臓中濃度を[表 2.6.6.B-10]及び[表 2.6.6.B-11]に示す。

表 2.6.6.B-10 ラットにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）:（投与 13 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
30	Female	2.98 ± 0.476	0.392 ± 0.0569	1.0 ± NC
	Male	4.30 ± 0.365	0.498 ± 0.0415	2.0 ± NC
	All	3.64 ± 0.321	0.425 ± 0.0308	1.0 ± NC
300	Female	14.6 ± 4.22	1.12 ± 0.0338	2.0 ± NC
	Male	15.6 ± 2.64	1.20 ± 0.202	4.0 ± NC
	All	15.1 ± 2.24	1.12 ± 0.142	4.0 ± NC
1000	Female	19.8 ± 1.05	1.33 ± 0.0891	8.0 ± NC
	Male	24.1 ± 1.14	1.76 ± 0.110	8.0 ± NC
	All	21.9 ± 1.16	1.54 ± 0.114	8.0 ± NC

NC = Not Calculated
MK-8742 concentrations in plasma from all control animals at 4 hours postdose were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM).
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7D]　Six-Month Oral Toxicity Study in Rats.TT#[redacted]-6033

表 2.6.6.B-11 ラットにエルバスビルを投与後の肝臓エルバスビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）:（投与 27 週、剖検時）

Dose (mg/kg/day)[b]	Female	Male
30	0.430 ± 0.138	0.942 ± 0.126
300	2.03 ± 0.477	6.83 ± 1.58
1000	6.34 ± 1.61	12.6 ± 1.99

a Assuming a liver density of 1.0 g/mL.
b MK-8742 liver concentrations from all control animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.229 μM).
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7D]　Six-Month Oral Toxicity Study in Rats.TT#[redacted]-6033

全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値の増加はすべての用量間で用量比を下回っていた。

平均肝臓エルバスビル濃度は用量に伴って増加し、全投与群において雄が雌の約2～3.4倍であった。なお、過去の試験の類似した用量と比較すると、TK パラメータは同程度であった。

これらの所見に基づき、NOEL は30 mg/kg/日未満であった。しかし、本試験で認められた変化の毒性学的意義は低く、NOAEL は1000 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 21.9 ± 1.16 μM·hr）であった。

2.6.6.B.3.7　イヌの14日間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6013）

[資料4.2.3.2.17: TT#[redacted]-6013]

ビーグル（雌雄各2例）に25 mg/kg/日のエルバスビルを、10%（w/w）ポリソルベート80水溶液

Confidential

を媒体として投与した（TT#[redacted]-6013）[2.6.7.B.7E 項]。

死亡、一般症状、体重、摂餌量、心電図検査、臨床及び解剖病理検査に基づき、毒性評価を行った。また、血漿中及び肝臓中のエルバスビル濃度を測定した。

投薬に関連した変化はみられなかった。

投与1日及び投与2週（投与14日）の血漿中エルバスビルの TK パラメータを[表 2.6.6.B-12]、[表 2.6.6.B-13]及び[表 2.6.6.B-14]に示す。

表 2.6.6.B-12 イヌにエルバスビル 25 mg/kg/日を投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 1 日）

Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
Female	15.2 ± ID	1.24 ± ID	2.0 ± ID
Male	7.05 ± ID	0.594 ± ID	3.0 ± ID
All	11.1 ± 4.29	0.914 ± 0.268	2.5 ± 0.50

ID = Insufficient Data
[Sec.2.6.7.B.7E]　Fourteen-Day Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6013

表 2.6.6.B-13 イヌにエルバスビル 25 mg/kg/日を投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）（投与 2 週）

Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
Female	21.1 ± ID	1.95 ± ID	3.0 ± ID
Male	10.9 ± ID	0.946 ± ID	4.0 ± ID
All	16.0 ± 4.50	1.45 ± 0.344	3.5 ± 0.50

ID = Insufficient Data
[Sec.2.6.7.B.7E]　Fourteen-Day Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6013

表 2.6.6.B-14 イヌにエルバスビル 25 mg/kg/日を投与後の個別及び平均肝臓エルバスビル濃度：（投与 15 日）

Animal	Concentration (μM) [a] in Female			
	10-0149	10-0177	Mean	SE
	5.33	3.58	4.46	ID
Animal	Concentration (μM) [a] in Male			
	10-0180	10-0182	Mean	SE
	2.29	5.97	4.13	ID

[a] Assuming a liver density of 1.0 g/mL.
ID = Insufficient Data
[Sec.2.6.7.B.7E]　Fourteen-Day Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6013

投与1日と投与2週とも、雌の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）及び C_{max} は雄に比べてが約1.9～2.2倍高かった。ただし、本試験で使用した動物数及び、1例の雌では他3例（雌1例と雄2例）に比べエルバスビル濃度が2～3倍高かったことを考慮すると、$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ 及び C_{max} について顕著な性差はないと考えられた。投与1日と投与2週の全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値には顕著な差はなく、初回投与後に定常状態に到達したことを示唆していた。剖検時にはすべての動物の肝臓で、高いエルバスビル濃度が認められた。

Confidential

投薬に関連した所見はみられず、NOEL は25 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 16.0 ± 4.50 μM·hr）以上であった。

2.6.6.B.3.8　イヌの3ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6025）

[資料4.2.3.2.18: TT#[redacted]-6025]

ビーグル（各群雌雄各3例）に、エルバスビルの0（対照群）、2、25又は1000 mg/kg/日を経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体のみを投与した（TT#[redacted]-6025）[2.6.7.B.7F 項]。

通常の評価項目に加え、被験物質投与群及び対照群の血漿中及び肝臓ホモジネート中エルバスビル濃度を測定した。

1000 mg/kg/日群の全動物で認められた投薬に関連した唯一の所見は、糞便の白色／薄茶色化であり、これは吸収されずに糞便中に排泄された被験物質に起因すると考えられた。

肉眼検査及び臓器重量について、投薬に関連した変化はみられなかった。

投薬に関連した病理組織学的変化は、1000 mg/kg/日群の雌雄及び25 mg/kg/日群の雄1例において認められた、小腸の腸管関連リンパ系組織（パイエル板）、大腸の腸管関連リンパ系組織、リンパ節、及び／又は脾臓での大型空胞化マクロファージ数の増加であった。超微細構造的には、この空胞化はライソソームのリン脂質蓄積（リン脂質症）に一致していた。これらの変化の重症度は、高用量群でごく軽度～軽度であり、中用量の雄ではごく軽度であった。さらに、リンパ系組織に空胞変化に関連するその他の変化、特にリンパ様細胞の減少又は炎症／壊死は認められておらず、血液学的検査でも空胞変化に伴う変化（白血球数又はリンパ球数の減少、循環血球の異常など）は認められなかった。したがって、重症度がごく軽度～軽度であったこと、リンパ系組織や循環血球にその他の影響がみられなかったことから、この組織形態学的所見の毒性学的意義は低いと考えられた。また、重要なことは、エルバスビルに伴うリン脂質症は、3ヵ月間の回復期間を設けたイヌの1ヵ月間経口投与毒性試験において回復性が示された（TT#[redacted]-1031）[2.6.7.B.17A 項])。

投与1週、5週及び13週の血漿中エルバスビルの平均 TK パラメータ、並びに投与14週の肝臓ホモジネート中のエルバスビル濃度を、[表 2.6.6.B-15]、[表 2.6.6.B-16]、[表 2.6.6.B-17]及び[表 2.6.6.B-18]に示す。

Confidential

表 2.6.6.B-15 イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）：（投与 1 日）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
2	Female	0.182 ± ID	0.0465 ± ID	2.0 ± ID
	Male[a]	0.183	0.0570	2.0
	All	0.182 ± 0.0219	0.0500 ± 0.00918	2.0 ± 0.0
25	Female	6.70 ± 1.22	0.908 ± 0.184	9.3 ± 7.3
	Male	5.45 ± 1.20	0.566 ± 0.143	2.3 ± 0.88
	All	6.08 ± 0.816	0.737 ± 0.129	5.8 ± 3.7
1000	Female	34.7 ± 4.68	1.82 ± 0.162	24 ± 0.0
	Male	18.6 ± 5.39	1.37 ± 0.443	11 ± 6.6
	All	26.6 ± 4.82	1.59 ± 0.233	18 ± 4.1

MK-8742 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM).
ID= Insufficient data
[a] Results from one male only, others had less than 3 consecutive concentrations above LLQ.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7F]　Three-Month Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6025

表 2.6.6.B-16 イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）：（投与 5 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
2	Female	0.160 ± ID	0.0366 ± ID	2.0 ± ID
	Male	0.204 ± ID	0.0490 ± ID	2.0 ± ID
	All	0.182 ± 0.0167	0.0428 ± 0.00614	2.0 ± 0.0
25	Female	6.04 ± 0.177	0.949 ± 0.133	2.0 ± 0.0
	Male	5.88 ± 1.87	0.494 ± 0.102	2.3 ± 0.88
	All	5.96 ± 0.839	0.721 ± 0.126	2.2 ± 0.40
1000	Female	22.3 ± 5.14	1.98 ± 0.465	4.0 ± 0.0
	Male	17.6 ± 5.49	1.50 ± 0.614	10 ± 7.0
	All	20.0 ± 3.53	1.74 ± 0.361	7.0 ± 3.4

MK-8742 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM).
ID = Insufficient Data
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7F]　Three-Month Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6025

Confidential

表 2.6.6.B-17 イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）:（投与 13 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
2	Female	ID	ID	ID
	Male	0.133 ± 0.0313	0.0341 ± 0.00390	1.3 ± 0.33
	All	ID	ID	ID
25	Female	5.48 ± 0.198	0.712 ± 0.233	2.3 ± 0.88
	Male	5.07 ± 1.15	0.345 ± 0.0824	1.7 ± 0.33
	All	5.28 ± 0.528	0.529 ± 0.138	2.0 ± 0.45
1000	Female	18.9 ± 2.59	1.36 ± 0.258	4.0 ± 0.0
	Male	19.7 ± 4.14	0.959 ± 0.210	11 ± 6.7
	All	19.3 ± 2.19	1.16 ± 0.174	7.3 ± 3.3

MK-8742 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM).
ID = Insufficient Data
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7F]　Three-Month Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6025

表 2.6.6.B-18 イヌにエルバスビルを投与後の肝臓エルバスビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）:（投与 14 週、剖検時）

Dose (mg/kg/day)	Female	Male
2	0 ± 0	0 ± 0
25	4.57 ± 1.47	16.7 ± 12.7
1000	14.5 ± 1.90	24.7 ± 3.07

[a] Assuming a liver density of 1.0 g/mL.
MK 8742 liver concentrations from all control animals were below the lower limit of quantitation (0.226 μM).
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7F]　Three-Month Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6025

全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値に顕著な性差はおおむねみられなかった。平均全身曝露量の増加は、低用量群と中用量群の比較では用量比を上回り、中用量群と高用量群の比較では用量比を下回っていた。一方で平均 C_{max} の増加は、低用量群と中用量群の比較ではほぼ用量に比例し、中用量群と高用量群の比較では用量比を下回っていた。投与1日、投与5週及び投与13週の全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値には顕著な差はなく、初回投与後に定常状態到達したことを示唆していた。低用量群の肝臓中エルバスビル濃度は、すべて LLQ を下回っていた。中用量群及び高用量群では平均肝臓エルバスビル濃度が、雌よりも雄で高く、用量の増加に伴って上昇した。

これらの結果に基づき、NOEL は2 mg/kg/日であった。しかし、本試験で認められた変化の毒性学的意義は低かったことから、NOAEL は1000 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 19.3±2.19 μM·hr）であった。

Confidential

2.6.6.B.3.9　　イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6030）

[資料4.2.3.2.19: TT#[redacted]-6030]

ビーグル（各群雌雄各4例）に、エルバスビルの0（対照群）、5、25又は1000 mg/kg/日のを経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し対照群には媒体のみを投与した（TT#[redacted]-6030）[2.6.7.B.7G 項]。

通常の評価項目に加え、被験物質投与群及び対照群の血漿中及び肝臓ホモジネート中エルバスビル濃度を測定した。

死亡例は認めなかった。

1000 mg/kg/日群の雌雄で投薬に関連した変化が認められた。これらは散発性の嘔吐、糞便の高頻度の変色及び時折認める糞便中の物質（両変化は主に白色又は薄茶色。糞便中に排泄された被験物質に起因するものと考えられる）、並びに、主に試験開始初期に認められた一過性又は間欠性の体重減少と、時折認める摂餌量減少であった。これらの変化は、動物の健康状態に大きく影響するものではなく、関連する病理組織所見を伴わなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

臨床病理パラメータ又は心電図及び眼科学的検査で、投薬に関連した変化はみられなかった。

病理組織学的検査では、投薬に関連した変化は、1000 mg/kg/日群（8/8例、おおむねごく軽度～軽度）及び25 mg/kg/日群（2/8例、ごく軽度）で認められた細胞質の空胞化に限られていた。空胞化は主に、リンパ系組織の濾胞領域、胃、小腸（パイエル板）、大腸の消化管関連リンパ系組織、及び胆嚢／リンパ節の孤立リンパ小節において認められた。変化（超微細構造的にリン脂質症に一致することが確認されている）の性質及び程度はおおむね、3ヵ月間エルバスビルを投与したイヌで認められたものと同程度であり、より長期間の投与によりこの所見が増悪しないことを示していた。リンパ系組織におけるその他の投薬に関連した影響、特にリンパ様細胞の減少はみられなかった。したがって、3ヵ月間投与毒性試験と同様、このような組織学的所見の毒性学的意義は低いと考えられる。

臓器重量又は肉眼検査で投薬に関連した変化はみられなかった。

血漿中濃度における TK パラメータ及び平均肝臓中濃度を[表 2.6.6.B-19]、[表 2.6.6.B-20]、[表 2.6.6.B-21]、[表 2.6.6.B-22]及び[表 2.6.6.B-23]に示す。

Confidential

表 2.6.6.B-19 イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）:（投与 1 日）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5	Female	0.972 ± 0.413	0.137 ± 0.0436	2.5 ± 0.50
	Male	0.885 ± 0.0924	0.103 ± 0.00994	2.5 ± 0.50
	All	0.928 ± 0.197	0.120 ± 0.0217	2.5 ± 0.33
25	Female	5.78 ± 0.686	0.741 ± 0.169	2.8 ± 0.75
	Male	3.91 ± 0.496	0.333 ± 0.0402	3.0 ± 0.58
	All	4.84 ± 0.528	0.537 ± 0.112	2.9 ± 0.44
1000	Female	31.6 ± 4.88	2.08 ± 0.519	20 ± 4.0
	Male	23.6 ± 3.45	1.41 ± 0.315	15 ± 5.3
	All	27.6 ± 3.16	1.75 ± 0.309	18 ± 3.2

MK-8742 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM) of the bioanalytical method.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6030

表 2.6.6.B-20 イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）:（投与 4 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5	Female	0.950 ± 0.230	0.175 ± 0.0784	2.3 ± 0.63
	Male	0.872 ± 0.205	0.0999 ± 0.0240	2.3 ± 0.63
	All	0.911 ± 0.143	0.138 ± 0.0406	2.3 ± 0.41
25	Female	4.20 ± 0.274	0.543 ± 0.0879	1.5 ± 0.29
	Male	4.39 ± 0.618	0.423 ± 0.0474	1.5 ± 0.29
	All	4.29 ± 0.315	0.483 ± 0.0515	1.5 ± 0.19
1000	Female	17.8 ± 4.20	1.52 ± 0.335	2.8 ± 0.75
	Male	20.1 ± 8.18	1.38 ± 0.356	14 ± 6.1
	All	18.9 ± 4.28	1.45 ± 0.228	8.1 ± 3.5

MK-8742 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM) of the bioanalytical method.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6030

Confidential

表 2.6.6.B-21 イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）:（投与 13 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5	Female	0.752 ± 0.0740	0.114 ± 0.0207	1.8 ± 0.25
	Male	0.665 ± 0.258	0.0867 ± 0.0272	3.0 ± 0.58
	All	0.709 ± 0.125	0.100 ± 0.0167	2.4 ± 0.38
25	Female	3.56 ± 0.730	0.474 ± 0.0763	1.5 ± 0.29
	Male	4.75 ± 0.807	0.384 ± 0.0724	2.3 ± 0.63
	All	4.15 ± 0.551	0.429 ± 0.0516	1.9 ± 0.35
1000	Female	22.5 ± 6.41	1.74 ± 0.279	9.0 ± 5.0
	Male	15.8 ± 5.67	1.65 ± 0.498	2.6 ± 0.85
	All	19.1 ± 4.16	1.69 ± 0.265	5.8 ± 2.6

MK-8742 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM) of the bioanalytical method.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6030

表 2.6.6.B-22 イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの平均パラメータ（平均±標準誤差）:（投与 26 週）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
5	Female	0.879 ± 0.105	0.0796 ± 0.00764	1.0 ± 0.0
	Male	0.905 ± 0.300	0.0844 ± 0.0222	2.1 ± 0.72
	All	0.892 ± 0.147	0.0820 ± 0.0109	1.6 ± 0.39
25	Female	4.45 ± 0.809	0.638 ± 0.109	1.5 ± 0.29
	Male	3.78 ± 0.499	0.311 ± 0.0480	2.0 ± 0.0
	All	4.11 ± 0.458	0.474 ± 0.0830	1.8 ± 0.16
1000	Female	17.6 ± 2.04	1.50 ± 0.279	8.5 ± 5.2
	Male	15.6 ± 6.24	1.11 ± 0.252	7.8 ± 5.5
	All	16.6 ± 3.06	1.31 ± 0.189	8.1 ± 3.5

MK-8742 concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM) of the bioanalytical method.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6030

表 2.6.6.B-23 イヌにエルバスビルを投与後の肝臓エルバスビル濃度（μM）[a]（平均±標準誤差）:（投与 39 週、剖検時）

Dose (mg/kg/day)	Female	Male	All
5	1.76 ± 0.975	0.507 ± 0.148	1.13 ± 0.514
25	1.78 ± 0.584	2.09 ± 0.808	1.93 ± 0.465
1000	9.62 ± 3.01	18.4 ± 7.01	14.0 ± 3.90

[a] Assuming a liver density of 1.0 g/mL.
MK-8742 liver concentrations from all control animals were below the lower limit of quantitation (0.229 μM) of the bioanalytical method.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.7G]　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs.TT#[redacted]-6030

Confidential

全投与群において、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値又は C_{max} 平均値におおむね事実上の性差はみられなかった。全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、5～25 mg/kg/日の用量範囲ではほぼ用量に比例したが、25～1000 mg/kg/日の用量範囲では用量比を下回った。おおむね、投与1日、投与4週、13週及び26週の全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値には全投与群において事実上の差はなく、初回投与後に定常状態に到達したことを示唆していた。

これらの所見に基づき、NOEL は5 mg/kg/日であった。しかし、本試験で認められた変化の毒性学的意義は低かったことから、NOAEL は1000 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 16.6 ± 3.06 μM·hr）であった。

2.6.6.B.4　遺伝毒性試験

エルバスビルの遺伝毒性について、ICH S2A 及び S2B 並びに最新の ICH S2 (R1)ガイダンスに準じて標準的な組合せの in vitro 及び in vivo 試験を実施したところ、エルバスビルに遺伝毒性は認められなかった。実施した試験は、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）（TT#[redacted]-8239、TT#[redacted]-8060）、染色体異常試験（TT#[redacted]-8536）、CHO 細胞の小核試験（TT#[redacted]-8688）、in vivo のラット小核試験（TT#[redacted]-6014、TT#[redacted]-8730）であった。

2.6.6.B.4.1　In Vitro 試験

2.6.6.B.4.1.1　細菌を用いる復帰突然変異試験（TT#[redacted]-8239、TT#[redacted]-8060）

[資料4.2.3.3.1.3: TT#[redacted]-8239]

ネズミチフス菌（TA1535、TA97a、TA98及び TA100）及び大腸菌（WP2 uvrA pKM101）を用いた復帰突然変異試験を実施し、エルバスビルの変異原性を評価した（TT#[redacted]-8239、TT#[redacted]-8060）[2.6.7.B.8A 項]。評価最終濃度は S-9の存在下及び非存在下ともに、100、300、1000、3000及び5000 μg/plate とした。高用量は ICH S2A、S2B 及び最新の ICH S2 (R1)ガイダンスで推奨されている用量を選択した。

用量設定試験（TT#[redacted]-8239）[2.6.7.B.8A 項]において、エルバスビルは対照群と比較して復帰変異コロニー数に2倍以上の増加を誘発しなかった。陽性対照物質処理により、S-9の存在／非存在下及び試験菌に応じて復帰変異コロニー数は適切に増加した。1000 μg/plate 以上の試験濃度では、大半のプレートに沈殿物が認められたが、プレート上のコロニーの計数には影響しなかった。いずれの用量においても背景の菌の生育阻害はみられなかった。一部の試験株では、最高用量で復帰変異コロニーの生育阻害が認められ、若干の毒性が示された。

確認試験（TT#[redacted]-8060）[2.6.7.B.8A 項]は GLP 適用下で実施した。その結果は、探索的な復帰突然変異試験でみられた陰性の結果が確認された（TT#[redacted]-8239）[2.6.7.B.8A 項]。

結論として、2試験のすべての試験菌株において、エルバスビル処理により復帰変異コロニー数は溶媒対照群と比較して2倍以上の用量に依存した増加を示さなかったことから、エルバスビルに変異原性はないと考えられた。

Confidential

2.6.6.B.4.1.2　チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いる in vitro 染色体異常試験（TT#[redacted]-8536）

[資料4.2.3.3.1.4: TT#[redacted]-8536]

チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO 細胞 WBL サブクローン）を用いた染色体異常試験を実施し、エルバスビルの染色体異常誘発能について評価した（TT#[redacted]-8536）[2.6.7.B.8B 項]。

用量設定試験及び染色体異常試験を、S-9存在下／非存在下での3時間処理、S-9非存在下での連続処理（約20時間）の2つの処理法で実施した。陰性対照群は1%ジメチルスルホキシド（DMSO）で処理した。陽性対照物質として、S-9存在下ではシクロホスファミドを、S-9非存在下ではマイトマイシン C を用いた。処理開始から約20時間後（正常な細胞周期の約1.5倍）に細胞を固定して染色体異常を評価した。

培地中に沈殿物が認められたため、エルバスビルの染色体異常試験で評価した最高用量は、培地中の被験物質の溶解性により限定された。染色体異常の観察は S-9の存在下及び非存在下で10、20及び30 μM で実施した（3時間及び20時間処理）。最高用量での細胞増殖率は、陰性対照と比較してそれぞれ98、83及び95%で、これよりわずかでも高用量では過剰な沈殿物が認められた。

高用量の陽性対照群における染色体異常を有する細胞の割合は、陰性対照群と比較して顕著な増加を示した。

エルバスビル処理により染色体構造異常の増加はみられなかった。

以上、CHO 細胞を用いて染色体異常試験を実施した結果、エルバスビルはその最大溶解濃度まで陰性であった。

2.6.6.B.4.1.3　チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いる in vitro 探索的小核試験（TT#[redacted]-8688）

[資料4.2.3.3.1.5: TT#[redacted]-8688]

CHO 細胞を用いて in vitro 小核試験を実施した結果、エルバスビルは陰性であった（TT#[redacted]-8688）[2.6.7.B.8 項]。培地中の溶解性が低かったことから、評価した最高用量は5 μM までであった。

2.6.6.B.4.2　In Vivo 試験

2.6.6.B.4.2.1　ラットの14日間経口投与毒性試験（小核試験、機能観察総合評価）（TT#[redacted]-6014）

[資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014]

ラットの14日間経口投与毒性試験において、雌雄ラットの骨髄多染性赤血球におけるエルバスビルの小核誘発能を評価した（TT#[redacted]-6014）[2.6.7.B.9A 項]。

Crl:WI（Han）ラット（各群雌雄各10例）に、エルバスビルの0（対照群）、100及び300 mg/kg/日あるいは1000 mg/kg b.i.d.（1日総投与量は2000 mg/kg）を約2週間経口投与した。媒体として100及び300 mg/kg/日群では10%（w/w）の、対照群及び1000 mg/kg b.i.d.群では5%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用した。最高用量は、限界量［ICH M3 (R2)ガイダンスに準拠］である1000 mg/kg を1日2回投与することで、エルバスビルの全身曝露を最大に得られるように設定した。毒性及び

Confidential

曝露量に関するデータは、TT#[redacted]-6014に関する項に記載した[2.6.7.B.9A 項]。死亡は認められず、投薬に関連した変化は毒性学的意義の低いものに限られていた。

エルバスビルの0、100及び300 mg/kg/日群並びに1000 mg/kg b.i.d.群について小核の計数を実施した。計数には、陽性対照として、雄ラットにマイトマイシン C を投与し、スライドを作成してコード化したものも含めた。媒体対照群と比較して、すべてのエルバスビル投与群で MN-PCE 頻度に統計学的に有意な増加はみられず、用量に関連した小核発現頻度の増加傾向もみられなかった。エルバスビル投与による骨髄 PCE の比率に対する影響もみられなかった

以上より、雌雄ラットにエルバスビルを100 mg/kg/日、300 mg/kg/日及び1000 mg/kg b.i.d.で約2週間経口投与しても、骨髄での小核誘発能は認められなかった。

2.6.6.B.4.2.2　ラットの探索的4日間経口投与試験（バイオマーカー、遺伝子発現試験）での骨髄小核試験（TT#[redacted]-8730）

[資料4.2.3.3.2.3: TT#[redacted]-8730]

雄性 Crl:WI（Han）ラットの探索的骨髄小核試験において、300 mg/kg/日まで投与しても、エルバスビルの骨髄での小核誘発能は認められなかった（TT#[redacted]-8730）[2.6.7.B.9 項]。媒体対照群と比較して、すべてのエルバスビル投与群で MN-PCE の頻度に顕著な増加はみられなかった。赤血球全体に対する骨髄 PCE の比率に対する影響もみられなかった。

2.6.6.B.5　がん原性試験

エルバスビルは、臨床で予定される連続投与期間が6ヵ月未満であり、慢性あるいは再発性の病態の治療において間欠的な方法で頻繁に用いられるものではなく、標準的な組合せの遺伝毒性試験でいずれの遺伝毒性も認められず、慢性毒性試験でいずれの増殖性の徴候の証拠も認められなかった。これらのことから、エルバスビルは患者の寿命の相当な期間にわたって規則的に投薬されることが予想されるものではなく、ICH S1A ガイダンスに従って、がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.B.6　生殖発生毒性試験

エルバスビルの生殖発生毒性について検討するため、ラット及びウサギを用いて試験を実施した。これらの試験の概要を[表 2.6.6.B-24]に示す。

Confidential

表 2.6.6.B-24 エルバスビルの生殖発生毒性試験（重要な試験）

Study	Species/Sex	Study Type	Doses Evaluated (mg/kg/day)	Formulation
TT#[redacted]-7290	Rat/F&M	Fertility	0, 50, 300, 1000[a]	10% PS80
TT#[redacted]-7170	Rat/F	EFD	0, 50, 300, 1000[a]	10% PS80
TT#[redacted]-7180	Rabbit/F	EFD	0, 30, 100, 1000[a]	10% PS80
TT#[redacted]-7020	Rat/F	PPND	0, 50, 300, 1000[a]	10% PS80

[a] High dose = Limit dose based on ICH M3 (R2) guidance.
EFD = Embryo-fetal developmental toxicity study.
PPND = Prenatal and postnatal developmental toxicity study.
F = Female.
M = Male.
10% PS80 = 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water.

[Sec.2.6.7.B.12A; 2.6.7.B.13A; 2.6.7.B.13B; 2.6.7.B.14]

2.6.6.B.6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.6.B.6.1.1　雌雄ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験（TT#[redacted]-7290)

[資料4.2.3.5.1.2: TT#[redacted]-7290]

エルバスビルの F_0の雌雄ラットに対する受胎能への影響を検討するため、雌雄ラットにエルバスビルを1日1回、交配前の15日間、交配期間、雌に関しては GD 7まで、雄に関しては計画屠殺の前日まで（約計6週間）、経口投与した（TT#[redacted]-7290）[2.6.7.B.12A 項]。

Crl:WI（Han）ラット（各群雌雄各20例）に、エルバスビルの0（対照群）、50、300又は1000 mg/日を投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体のみを投与した。無処置群として雌雄各20匹を設定し、交配期間中にそれぞれ高用量群の雄及び雌と交配させた。

雌雄ラットの毒性評価は、死亡、一般状態、体重、摂餌量、及び剖検（胸部及び腹部）により実施した。雌ラットにエルバスビルを15日間投与後、雄ラットと1対1で最大18日間（18夜）同居させ、交配及び生殖成績を評価した。高用量群の雌を無処置群の雄と、高用量群の雄は無処置群の雌とそれぞれ同居させた。対照群、低用量群及び中用量群の雌は、それぞれ同用量群の雄と同居させた。妊娠15～17に交配した雌を帝王切開し、胚／胎児生存率及び黄体数の評価を実施した。雄の生殖毒性評価として、精子数、精子の運動性及び精巣重量も測定した。

雌雄ラットに死亡はみられず、一般状態及び肉眼所見に投薬に関連した変化はみられなかった。

中用量及び高用量群の雌では、交配4日前に一過性で投薬に関連した平均摂餌量の減少（対照群と比較してそれぞれ11%及び16%減少）が認められたが、平均体重増加量には投薬に関連した影響はみられなかった。中用量及び高用量群の雄では、投与1～3週に平均体重増加量の投薬に関連した減少が認められた（対照群と比較してそれぞれ29%及び33%減少）。また、平均摂餌量の減少が、投与1週（対照群と比較してそれぞれ16%及び18%減少）並びに投与2週（対照群と比較してそれぞれ9.1%及び9.8%減少）において認められた。このような体重及び摂餌量の変化はおおむね軽微かつ一過性であったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。50 mg/kg/日群では摂餌量及び体重に対して、投薬に関連した影響はみられなかった。

高用量群の雄では、精巣上体尾部1 g 当たりの精子数の減少（14%、対照群との比較）が認めら

Confidential

れた。しかし、生殖成績、受胎能、胚／胎児生存率、平均精巣重量及び精子の運動性などのいずれの生殖パラメータにも投薬に関連した影響はみられなかった。高用量群の雌、50 mg/kg/日群の雌雄、及び300 mg/kg/日群の雌雄に、投薬に関連した生殖毒性はみられなかった。

以上より、雌ラットの受胎能に関する NOEL は1000 mg/kg/日以上であった。雄ラットでは平均精子数の軽度の減少が認められたことから、雄ラットの受胎能に関する NOEL は300 mg/kg/日であった。精子数の減少に関しては、生殖成績、受胎能、胚／胎児生存率、平均精巣重量及び精子の運動性により評価した生殖能において随伴する影響は認められず、ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6033）[2.6.7.B.7D 項]及びイヌの9ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-6030）[2.6.7.B.7G 項]において精巣に病理組織学的変化はみられなかったことから毒性学的意義は低いと判断し、雌雄ラットの受胎能に関する NOAEL は1000 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 17.3 ± 1.23 μM·hr、ラットの3ヵ月間経口投与毒性試験の投与13週の評価）以上であった（TT#[redacted]-6024）[2.6.7.B.7C 項]。本試験の一般毒性に関する NOEL は、雌雄ラットとも50 mg/kg/日であった。しかし、一般毒性パラメータの変化の毒性学的意義は低いと考えられたことから、NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。

2.6.6.B.6.2　胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.B.6.2.1　妊娠ラットの探索的経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-7175）

[資料4.2.3.5.2.14: TT#[redacted]-7175]

本試験の目的は、以後のラットの胚・胎児発生毒性試験に用いるエルバスビルの用量を検討することであった（TT#[redacted]-7175）[2.6.7.B.11 項]。

交配日を揃えた、妊娠していると想定される雌の Crl:WI（Han）ラット（交配確認日を GD 0とした）を群分けし（各群6匹）、エルバスビルの0（対照群），30、100、300又は1000 mg/kg/日を GD 6から GD 20まで経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体のみを投与した。

母動物の毒性評価は、死亡、一般状態、体重及び摂餌量により実施した。母動物のすべての生存例は GD 21に帝王切開し黄体数及び胎盤（肉眼）の評価を含む子宮内容物の評価を実施した。胚・胎児発生毒性は、胚／胎児生存率、胎児体重、性比及び外表観察により実施した。

投薬に関連した死亡はみられなかった。

母動物の一般状態、平均体重増加量及び平均摂餌量に投薬に関連した変化はみられなかった。いずれの投与量においても胚･胎児発生毒性パラメータに投薬に関連した変化はみられなかった。

母動物又は胚・胎児発生毒性は、1000 mg/kg/日の限界用量までみられなかった。以上の結果より、以降に続くラットの胚・胎児発生に関する試験において、1000 mg/kg/日は最高用量として推奨された。

2.6.6.B.6.2.2　ラットの経口投与胚胎児発生毒性・TK 試験（TT#[redacted]-7170）

[資料4.2.3.5.2.15: TT#[redacted]-7170]

妊娠ラットにエルバスビルを GD 6～GD 20に経口投与したときの胚・胎児発生毒性について評価した。さらに、エルバスビルの TK プロファイルを GD 15に評価した（TT#[redacted]-7170）[2.6.7.B.13A

Confidential

項]。

交配日を揃えた、妊娠していると想定される雌の Crl:WI（Han）ラット（交配確認日を GD 0とした）を群分けし、3つの投与群（各28匹）又は対照群（24匹）に割り当てた。エルバスビルの0（対照群）、50、300又は1000 mg/kg/日を GD 6～20に経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体のみを投与した。最高用量の1000 mg/kg/日は、ICH S5 (R2)ガイドラインに従った生殖毒性試験の限界用量である。

母動物の毒性評価は死亡、一般状態、体重、摂餌量及び剖検（胸部及び胸部臓器）により実施した。GD 15/16に投与群及び対照群から非絶食下で採血し、血漿中の被験物質濃度を測定した。母動物のすべての生存例（各群20例）は GD 21に帝王切開し、黄体数及び胎盤（肉眼）の評価を含む子宮内容物の評価を実施した。胚・胎児発生毒性の評価は胚／胎児生存率、胎児体重、性比並びに外表、内臓、頭部及び骨格観察により実施した。骨格観察はアリザリンレッド染色及びマイクロ CT を用いて行った。

投薬に関連した死亡はみられず、母動物の一般状態、平均摂餌量及び胸腹部内臓の肉眼所見に変化はみられなかった。

1000 mg/kg/日群では、GD 6から GD 21までの母動物の平均体重増加量（対照群と比較して13%減少）、及び総胎児体重で補正した GD 6から GD 21までの母動物平均体重増加量（対照群と比較して19%減少）について、エルバスビルに関連した軽度の減少が認められた。母動物の体重増加量の減少に関しては、軽度であったことから毒性学的意義は低いと考えられる。

すべての投与群で胚・胎児発生毒性はみられなかった。

TK パラメータを[表 2.6.6.B-25]に示す。

表 2.6.6.B-25 血漿中エルバスビル濃度（平均±標準誤差）: GD 15

	Elbasvir (mg/kg/day)[a]		
	Females		
	50	300	1000
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	4.85 ± 0.957	11.4 ± 2.47	21.8 ± 1.79
C_{max} (μM)	0.932 ± 0.412	1.12 ± 0.229	1.45 ± 0.144
T_{max} (hr)	2.0 ± NC	2.0 ± NC	8.0 ± NC

a No test article levels detected above LLQ of the bioanalytical method in control plasma samples.
NC = Not calculated.

[Sec.2.6.7.B.13A]　Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats.TT#[redacted]-7170

全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値及び C_{max} 平均値の増加率は、すべての用量間で用量比を下回っていた。対照群のすべての母動物の血漿中エルバスビル濃度は、GD 15の投与4時間後の生体試料中薬物濃度分析にて LLQ（LLQ = 0.023 μM）未満であった。さらに、妊娠ラットの全身曝露量平均値及び C_{max} 平均値は、同じ用量を投与した非妊娠ラットで得られた値と同程度であった。

本試験結果から、母動物毒性の NOEL は300 mg/kg/日であった。しかし、本試験において母動物で認められた変化の毒性学的意義は低く、母動物に関する NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。胚・胎児発生毒性に関する NOAEL も1000 mg/kg/日以上であった（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$:21.8 ± 1.79 μM·hr）。

Confidential

2.6.6.B.6.2.3　妊娠ウサギの探索的経口投与用量設定試験（TT#[redacted]-7185）

[資料4.2.3.5.2.16: TT#[redacted]-7185]

本試験の目的は、以後のウサギの胚・胎児発生毒性試験に用いるエルバスビルの用量を検討することであった（TT#[redacted]-7185）[2.6.7.B.11 項]。

妊娠していると推定される雌の Dutch Belted ウサギを GD 0（交配確認日）に群分けし（各群6匹）、エルバスビルの0（対照群）、30、100、300又は1000 mg/kg/日を GD 7～GD 20に経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体のみを投与した。

母動物の毒性評価は死亡、一般状態、体重、摂餌量により実施した。GD 28にすべての生存例は帝王切開し、黄体数及び胎盤（肉眼）の評価を含む子宮内容物の評価を実施した。胚・胎児発生毒性の評価は胚／胎児生存率、胎児体重及び胎児の外表観察により実施した。

投薬に関連した死亡はみられなかった。

母動物の一般状態、平均体重増加量及び平均摂餌量に投薬に関連した変化はみられなかった。いずれの投与量においても胚・胎児発生毒性を示す変化はみられなかった。

以上の結果から、以降に続くウサギの胚／胎児発生毒性試験において、1000 mg/kg/日は最高用量として推奨された。

2.6.6.B.6.2.4　ウサギの経口投与胚胎児発生毒性・TK 試験（TT#[redacted]-7180）

[資料4.2.3.5.2.17: TT#[redacted]-7180]

ウサギにエルバスビルを GD 7～GD 20に経口投与し、ウサギの胚・胎児発生に対する毒性を評価した。さらに、エルバスビルの TK プロファイルを GD 15に評価した（TT#[redacted]-7180）[2.6.7.B.13B 項]。

交配日を揃えた、妊娠していると想定される Dutch Belted ウサギ（交配確認日を GD 0とした）を群分けし（各群23匹）、エルバスビルの0（対照群）、30、100又は1000 mg/kg/日を GD 7～GD 20に経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体のみを投与した。最高用量の1000 mg/kg/日は、ICH S5 (R2)ガイドラインに従った生殖毒性試験の限界用量である。

母動物の毒性評価は、死亡、一般状態、体重、摂餌量及び剖検（胸部及び腹部臓器）により実施した。投与群及び対照群から GD 15/16に非絶食下で採血し、血漿中の被験物質濃度を測定した。母動物のすべての生存例は GD 28に帝王切開し、黄体数及び胎盤（肉眼）の評価を含む子宮内容物の評価を実施した。胚・胎児発生毒性の評価は、胚／胎児生存率、胎児体重、性比並びに外表、内臓、頭部及び骨格観察により実施した。

投薬に関連した死亡はみられなかった。

いずれの投与量においても、母動物の一般状態、平均体重増加量、平均摂餌量、及び胸腹部臓器の肉眼所見に、エルバスビルに関連した変化はみられなかった。

いずれの投与量においても胚・胎児発生毒性はみられなかった。

TK パラメータを[表 2.6.6.B-26]に示す。

Confidential

表 2.6.6.B-26 ウサギにエルバスビルを投与後の母動物の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）：GD 15

Dose (mg/kg/day)	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr r)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
30	1.27 ± 0.0649	0.333 ± 0.0842	1.8 ± 0.75
100	4.16 ± 1.57	0.517 ± 0.140	1.5 ± 0.29
1000	39.4 ± 9.20	1.93 ± 0.503	8.8 ± 5.3

MK-8742 concentration in plasma from 1/4 control animals at 8 hours post-dose was above the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 μM) and was less than 11% of the mean C_{max} value of the low-dose group.
MK-8742 = Elbasvir.
[Sec.2.6.7.B.13B]　Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rabbits.TT#[redacted]-7180

全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）平均値は3用量でほぼ用量に比例した増加を示し、C_{max} 平均値は用量比を下回る増加を示した。対照群の1例のエルバスビル濃度は1時点で LLQ（LLQ = 0.023 μM）をわずかに上回っていたが、低用量群の C_{max} 平均値の11%よりも低かった。対照群の1例の1時点のみで測定されたエルバスビル血漿中濃度は､低用量群の血漿中濃度と比較して低かったことから、本事象は TK 及び毒性評価の妥当性及び信頼性に影響を与えないと考えられた。

以上の結果から、母動物及び胚・胎児発生毒性における NOEL はいずれも1000 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 39.4 ± 9.20 μM·hr）以上であった。

2.6.6.B.6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.6.B.6.3.1　ラットの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（経口投与）（TT#[redacted]-7020）

[資料4.2.3.5.3.2: TT#[redacted]-7020]

F_0妊娠ラットに GD 6～LD 20までエルバスビルを経口投与し、F_1出生児の発生、発育、行動、生殖成績及び受胎能に対する影響を評価した（TT#[redacted]-7020）[2.6.7.B.14 項]。

交配日を合わせた雌性 Crl:WI（Han）ラット（交配確認日を GD 0とした）を群分けし（各群20匹)、エルバスビルの0（対照群)、50、300又は1000 mg/kg/日を GD 6～LD 20に1日1回経口投与した。媒体として10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を使用し、対照群には媒体のみを投与した。最高用量の1000 mg/kg/日は、ICH S5 (R2)ガイドラインに従った生殖発生毒性試験の限界用量である。

母動物の毒性評価は、死亡、一般状態、体重、摂餌量及び剖検（胸部及び腹部臓器）により実施した。F_1出生児の毒性評価は、着床後死亡率、外表観察、死亡、一般状態、体重、性成熟、行動検査、生殖成績及び受胎能により実施した。

いずれの投与量においても、母動物及び F_1出生児に投薬に関連した死亡、及び一般状態の変化はみられなかった。

母動物では、エルバスビルに関連した肉眼所見の変化はみられなかった。1000 mg/kg/日群で、GD 6から8における母動物の平均体重増加量に一過性の減少（対照群と比較して47%減少)、及び

Confidential

GD8における平均摂餌量の減少（対照群と比較して13%減少）が認められた。50 mg/kg/日群及び300 mg/kg/日群では、体重又は摂餌量に影響は認められなかった。

F_1世代ではすべての用量で、着床後死亡率、外表観察、一般状態、体重、性成熟（膣開口あるいは包皮分離）、行動検査（受動的回避学習、驚愕反応試験及びオープンフィールド試験）、生殖成績及び受胎能に、投薬に関連した影響はみられなかった。

以上の結果より、エルバスビルに関連した母動物での変化は、1000　mg/kg/日群でみられた一過性の母動物体重増加量及び摂餌量の減少であった。これらの変化は一過性であったことから、毒性学的意義は低いと判定された。これらの結果に基づき、F_0世代の NOEL は300 mg/kg/日であった。しかし、F_0世代で認められた変化の毒性学的意義は低いと判断し、NOAEL は1000 mg/kg/日｛$AUC_{0\text{-}24\,hr}$ = 21.8 ± 1.79 μM·hr、ラットの経口投与胚胎児発生毒性・TK 試験で測定（TT#[redacted]-7170）[2.6.7.B.13A 項]｝以上であった。F_1世代では、発生、発育、行動、生殖成績及び受胎能に、投薬に関連した影響は認められず、F_1出生児に関する NOEL は1000 mg/kg/日以上であった。

2.6.6.B.6.4　幼若動物を用いた試験

現時点でエルバスビルの小児適応を予定していないため、出生児（幼若動物）に直接投与する試験を実施していない。しかし、エルバスビルの非臨床試験（試験開始時におおむね性的に未成熟な幼若動物を用いた試験）及び臨床試験では年齢に関連した安全上の懸念はみられなかった。さらに、エルバスビルは授乳ラットの乳汁中へ移行するため、ラットの出生後の発生試験では、授乳期間中に幼若ラットは間接的にエルバスビルに曝露されていた。よって、これら非臨床試験により、小児への適応に対する臨床開発を十分裏付けると考えられる。

2.6.6.B.7　局所刺激性試験

化合物の作業時安全に関するデータを得るため、局所刺激性試験（ウシ角膜を用いる混濁度及び透過性試験、並びに MatTek EpiDerm™ MTT Vialibility 試験）を実施した。

2.6.6.B.7.1　ウシ角膜を用いる混濁度及び透過性試験（BCOP）（TT#[redacted]-7807）

[資料4.2.3.6.3: TT#[redacted]-7807]

5枚のウシ角膜に20%のエルバスビル溶液を32℃で4時間曝露した（TT#[redacted]-7807）[2.6.7.B.16 項]。洗浄終了後、混濁度及びフルオレセイン透過性を測定した。エルバスビルは無刺激性（in vitro 刺激性スコア＝0.56）と分類された。

2.6.6.B.7.2　MatTek EpiDerm™ MTT Vialibility 試験（TT#[redacted]-7806）

[資料4.2.3.6.4: TT#[redacted]-7806]

被験物質100 mg を EpiDerm™組織の表面に1、4、24時間適用し、洗浄後 methyl thiazol tetrazolium（MTT）の還元反応を用いて組織のバイアビリティを評価した。ET_{50}（EpiDerm™の組織バイアビリティが陰性対照組織の50%に減少するまでの時間）を測定し、刺激性を分類した（TT#[redacted]-7806）[2.6.7.B.16 項]。

Confidential

エルバスビルは皮膚無刺激性と分類された（ET_{50}>24）。

2.6.6.B.8　その他の毒性試験

2.6.6.B.8.1　抗原性試験

標準的な反復投与毒性試験において、エルバスビルの抗原性に起因すると考えられる所見又は変化はみられなかった。よって、抗原性試験は実施しなかった。

2.6.6.B.8.2　免疫毒性試験

ICH S8ガイドライン「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」の2.1.1項に概説されている免疫毒性を示唆する所見、すなわち、顕著な血液学的変化（白血球又はリンパ球の変化）、脾臓、胸腺、リンパ節又は骨髄の臓器重量又は組織像の変化、血清免疫グロブリン濃度の変化を示唆する血清グロブリン濃度の変化、感染発生率の増加、腫瘍発生率の増加はいずれもみられなかった。イヌでは細胞質の空胞化が、リンパ節、胃／小腸（パイエル板）／大腸のリンパ系組織、及び胆嚢／脾臓の孤立リンパ小節において認められ、これは超微細構造的にライソソームのリン脂質蓄積（リン脂質症）に一致していた。ただし、ラット及びマウスでは空胞化はみられなかった。本リン脂質症には、リンパ様細胞の減少は伴っていない。2.2項の「重要性に基づいた評価」に述べられているように、一つの要因でもそれが重要な所見である場合、又は単独では十分な根拠とならないが二つ以上の要因が認められた場合は、免疫毒性試験を追加で実施する必要がある場合がある。ラット及びイヌのエルバスビル毒性試験で、免疫毒性を示唆する所見はみられなかったことから、免疫毒性試験を別途実施しなかった。

化合物の作業時安全性に関するデータを得るための試験として、マウスの局所リンパ節試験（LLNA）を実施した。

2.6.6.B.8.2.1　マウスの局所リンパ節試験（LLNA）（TT#[redacted]-7805）

[資料4.2.3.7.2.2: TT#[redacted]-7805]

CBA/J マウス（各群5匹）の各耳の背側に、5、10又は25%のエルバスビル溶液、25% α-ヘキシルシンナムアルデヒド（陽性対照）、又はジメチルホルムアミド（溶媒対照）を、1日1回3日間反復して局所塗布した（TT#[redacted]-7805）[2.6.7.B.17 項]。体重測定及び一般状態観察を行い、毒性及び皮膚刺激性を示唆する所見について検討した。リンパ節内の増殖性細胞への5-ブロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU）の取り込み量を測定し、溶媒対照群（平均値）に対する各被験物質群の BrdU の取り込み量の比（Stimulation index：SI）を算出した。

被検物質に関連した一般状態又は体重の変化はみられなかった。エルバスビルの SI 値は全濃度群において3倍未満であったため、本化合物に皮膚感作性はないと考えられた。

2.6.6.B.8.3　毒性発現の機序に関する試験

毒性発現の機序に関する試験は実施していない。

Confidential

2.6.6.B.8.4　依存性

アルビノラット及び有色ラットに[^{14}C]エルバスビルを経口投与し、QWBA を実施した結果[2.6.4.B.5.1.1 項]、脳へのエルバスビルの蓄積は示されなかった。さらに、エルバスビルの薬理学的プロファイル（off-target プロファイルを含む）から薬物乱用傾向を示す可能性は示唆されず[2.6.2.B.3.1.1 項]、標準的な反復投与毒性試験において向精神作用（鎮静作用又は刺激作用）は認められなかった[2.6.2.B.3 項]。したがって、動物を用いた依存性試験は実施しなかった。

2.6.6.B.8.5　代謝物に関する試験

ヒト血漿中に代謝物は検出されなかった[2.6.4.B.5.1.4 項]。これにより、エルバスビルは代謝物の安全性評価に関連する ICH M3 (R2)ガイダンスの要件に合致したため、個々の代謝物に関する試験は実施しなかった。さらに、ヒトにおけるエルバスビルのすべての代謝物（肝ミクロソームを用いた in vitro 試験で同定された、又はヒト排泄物中に検出された代謝物）は、ラット又はイヌでも生成された[2.6.4.B.5.1 項]。

2.6.6.B.8.6　不純物に関する試験

個々の不純物に関する非臨床試験は実施しなかった。すべての不純物は、非臨床毒性試験の評価に用いたバッチに含まれていたことにより安全性が評価されたか[表 2.6.6.B-27]、原薬の不純物に関する ICH Q3A (R2)ガイドラインにて規定された安全性確認の必要な閾値を超えないものであった。さらに、ICH M7ガイドラインに従って不純物の潜在的変異原性についても評価した。変異原性不純物及びその管理の詳細については、3.2.S.3.2項（エルバスビル）を参照のこと。

Confidential

表 2.6.6.B-27 安全性の確認が必要なエルバスビル不純物及びそのヒト摂取量に対するラット摂取量比

Impurity	Specification Limits (%)	Impurity Level (%)[a]	Rat Total Daily Intake of Impurity (mg/kg)[b]	Human Total Daily Intake of Impurity (mg/kg)[c]	Dose Multiple based on (mg/kg)[d]	Rat Total Daily Intake of Impurity (mg/m^2)[e]	Human Total Daily Intake of Impurity (mg/m^2)[f]	Dose Multiple based on mg/m^2[g]
不純物C*	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	467	[redacted]	[redacted]	76
不純物D*	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	300	[redacted]	[redacted]	49
不純物E*	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	1450	[redacted]	[redacted]	235

a Based on the nonclinical Batch/Lot #[redacted] used for approximately 4 months in the 6-month GLP toxicity study in rats (TT#[redacted]-6033) [Sec.2.6.6.B.3.6] for 不純物C* and 不純物D* ; on the nonclinical Batch/Lot #[redacted] used for approximately 2 months in the 6-month GLP toxicity study in rats (TT#[redacted]-6033) [Sec.2.6.6.B.3.6] for 不純物E* .Batch/Lot #[redacted], also containing 不純物C* ([redacted]%), 不純物D* ([redacted]%·) and 不純物E* ([redacted]%·) was used in GLP genetic toxicology studies.
b Rat total daily intake calculated based on a NOAEL of 1000 mg/kg in the 6-month GLP toxicity study in rats (TT#[redacted]-6033) [Sec.2.6.6.B.3.6].
c Based upon a total daily dose of Elbasvir of 50 mg and presuming a 60 kg patient.
d Dose multiple was calculated as a ratio of total daily intake in rats (mg/kg) divided by the total daily intake in humans (mg/kg).
e Based upon a mg/kg to mg/m^2 conversion factor of 6 for rat; *i.e.* mg/kg X 6 equals rat dose on basis of mg/m^2.
f Based upon a mg/kg to mg/m^2 conversion factor of 37 for an adult human; *i.e.* mg/kg X 37 equals adult human dose on basis of mg/m^2.
g Dose multiple was calculated as a ratio of total daily intake in rats (mg/m^2) divided by the total daily intake in humans (mg/m^2).

* 新薬承認情報提供時に置き換え

Confidential

2.6.6.B.8.7　その他の試験

2.6.6.B.8.7.1　光毒性試験

エルバスビルは波長領域290～700 nm で光吸収を示し、モル吸光係数は1000 L/mol/cm 超であった[3.2.S.3.1項（エルバスビル）]。さらに、有色ラット及びアルビノラットに[^{14}C]エルバスビルを経口投与し QWBA 測定した試験で、有色ラットのブドウ膜に放射能が保持されていたことから、エルバスビルがメラニンに結合する可能性が示唆された[2.6.5.B.4 項] [2.6.5.B.5 項]。そのため、雄性有色ラットを用いて光毒性試験を実施した（TT#[redacted]-9042）[2.6.7.B.17 項]。エルバスビルを投与（100 mg/kg/日、1000 mg/kg/日）した雄性有色ラットの眼及び皮膚に光毒性はみられず、エルバスビルに光毒性の懸念がないことが示唆された。

2.6.6.B.8.7.1.1　有色ラットの3日間経口投与光毒性及び生体試料分析（TT#[redacted]-9042）

[資料4.2.3.7.7.5: TT#[redacted]-9042]

本試験の目的は、雄性有色ラットにエルバスビルを3日間反復経口投与後、擬似太陽光を照射したときの光毒性を評価することであった（TT#[redacted]-9042）[2.6.7.B.17 項]。

雄性 Crl:LE ラットにエルバスビルの100 mg/kg/日又は1000 mg/kg/日を3日間投与した。最高用量は、ICH M3 (R2)ガイダンスに従った限界用量である。投与3日の最終投与約4時間後（対照群及び低用量群）又は投与約6時間後（高用量群）から30分間、麻酔下ラットの眼及び皮膚（剃毛済み）に最小紅斑線量の0.5倍に相当する量の UVR を照射した。光毒性を示唆する皮膚反応はみられなかったため、剖検で皮膚の採取は行わず、眼球のみを採取して眼の病理組織学的検査を実施した。血漿中エルバスビル濃度を測定するため、同様にエルバスビルを投与した別の動物群より、投与3日の最終投与から2、4、6及び8時間後に採血した。

試験期間中に死亡はみられなかった。また、投薬に関連した一般状態の変化及び体重変化はみられなかった。

疑似太陽光の UVR 照射により、光毒性を示唆する皮膚反応はみられなかった。

眼科学的検査では、対照物質又はエルバスビルの経口投与に関連すると思われる所見は認められなかった。

眼の病理組織学的検査では、投薬に関連した変化はみられなかった。

血漿中濃度を測定した結果、対照群のすべてのラットでエルバスビル濃度は定量限界未満であった。エルバスビル投与群では、投与 2、4、6 及び 8 時間後の血漿中エルバスビル濃度は、これまでにラットを用いて実施した同様の投与量及び測定時期で得られた血漿中エルバスビル濃度と一致していた。

以上より、エルバスビル（100 mg/kg/日又は1000 mg/kg/日）を3日間経口投与し、最終投与から約4～6時間後に疑似太陽光 UVR を照射しても、光毒性を示唆する皮膚反応及び眼所見はみられなかった。

Confidential

2.6.6.B.8.7.2　回復性試験

2.6.6.B.8.7.2.1　イヌの3ヵ月間休薬期間を設けた1ヵ月間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-1031）

[資料4.2.3.7.7.6: TT#[redacted]-1031]

イヌの反復投与試験において認められたリン脂質症の回復性を評価するため、1ヵ月間経口投与しその後3ヵ月間休薬回復期間を設けた毒性試験を実施した（TT#[redacted]-1031）[2.6.7.B.17A 項]。

雌ビーグルを2群に割り付けた。1群（18匹）には1000 mg/kg/日のエルバスビルを、10%（w/w）ポリソルベート80水溶液を媒体として投与した。対照群（6例）には媒体のみを投与した。対照群のすべてのイヌ及びエルバスビル投与群の6例のイヌは、約1ヵ月間の投与後に剖検した。エルバスビル投与群の6例は、約3ヵ月間の休薬期間後に剖検した。当初、6ヵ月間の休薬期間後の剖検も計画していたが、1ヵ月間の投与期間後に認められたエルバスビルに関連した変化は3ヵ月間の休薬期間後に回復が認められたため、残りのエルバスビル投与群の6例は、剖検せず動物コロニーに戻した。

毒性評価は死亡、一般状態、体重及び病理検査に基づいて実施した。1ヵ月の投与期間後及び3ヵ月の休薬期間後に、腸間膜リンパ節の TEM 検査を行った。投与群及び対照群の、投与1日の血漿中薬物濃度を測定した。

すべての動物は、予定剖検時まで生存した。

投与期間に認められたエルバスビルに関連した変化（糞便の白色化、嘔吐、体重減少）は、イヌの9ヵ月間毒性試験において既に認められていたものであった[2.6.6.B.3.9 項]。エルバスビル投与群の2例のイヌで認められた、皮膚緊張の低下及び痩せた外観は、体重減少と相関していた。このような変化は1ヵ月間の投与期間に限定したものであり、3ヵ月間の休薬期間で回復した。このことは、これらの変化には完全に回復性があることを示唆している。

1ヵ月の投与期間終了後の剖検で認められたエルバスビルに関連した変化は、小腸（パイエル板）及び大腸の腸管関連リンパ系組織、並びに脾臓／リンパ節の空胞化であった。大型の空胞が増加したマクロファージ（リンパ系組織の濾胞領域で最も顕著）が存在し、超微細構造的にはミエリン形態を含むライソソームが増加した空胞化マクロファージである特徴を持つ本変化は、リン脂質症と一致し、イヌの反復投与毒性試験において既に観察されていた形状及び分布と類似していた[2.6.6.B.3.8 項]、[2.6.6.B.3.9 項]、[2.6.6.B.8.7.3 項]。3ヵ月の休薬期間終了後の剖検の病理組織学的又は TEM 検査所見では異常所見は認められず、エルバスビルに関連したリン脂質症には完全に回復性があることを示唆していた。

TK パラメータを[表 2.6.6.B-28]に示す。

Confidential

表 2.6.6.B-28 イヌにエルバスビルを投与後の血漿中エルバスビルの TK パラメータ（平均±標準誤差）:（投与 1 日）

Dose (mg/kg/day)	Sex	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr)	C_{max} (μM)	T_{max} (hr)
1000	Female	27.1 ± 4.68	2.12 ± 0.294	12 ± 2.4
Plasma Elbasvir concentrations in all control samples were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.0227 μM).				

[Sec. 2.6.7.B.17A]　One-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a Three-Month Treatment-Free Period.　TT#[redacted]-1031

本試験での TK パラメータは、以前に行ったイヌの3ヵ月間又は9ヵ月間毒性試験で、1000 mg/kg/日投与群の投与1日の TK パラメータと一致している[2.6.6.B.3.8 項]、[2.6.6.B.3.9 項]。

結論として、エルバスビルに関連した変化、すなわち糞便の白色化、嘔吐、体重減少（時折、皮膚緊張の低下と痩せた外観を伴う）、及びリンパ系組織のリン脂質症には回復性があることが確認された。

2.6.6.B.8.7.3　併用投与毒性試験

グラゾプレビル及びエルバスビルをそれぞれ単独投与したときの非臨床安全性試験の結果より、重複する毒性所見又はグラゾプレビル／エルバスビル併用に関して懸念すべき事項は特に認められなかった（A 項「Grazoprevir」参照）。したがって、ICH M3(R2)の「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に関する質疑応答集（Q&A）の「配合剤のための毒性試験」の質問9に従うとグラゾプレビル/エルバスビル併用投与の非臨床毒性試験は必要でない。しかし、グラゾプレビル/エルバスビルの臨床プログラム開始時に HCV に対する DAA の併用投与を担保するためのその非臨床安全性試験の実施が要求される規制的状況となることを考慮し、エルバスビル/グラゾプレビルを0/5、25/0、25/5 mg/kg/日で1ヵ月間経口併用投与する毒性試験を実施した[2.6.7.B.17B 項]。本試験の詳細を[2.6.6.A.8.7.2.1 項]に示す。要約すると、併用投与毒性試験において認められた変化はエルバスビルに起因するものであった。エルバスビルをグラゾプレビルと併用投与したとき、その結果に毒性的に顕著な差はみられなかった。さらに、本試験で認められた変化の毒性学的意義は低く、エルバスビル/グラゾプレビル併用投与の NOAEL は25/5 mg/kg/日であった。

エルバスビル、リバビリン及びソホスブビルの非臨床及び臨床経験から、HCV 感染患者に対して、エルバスビルとリバビリン又はソホスブビルを併用投与することに懸念すべき事項は特に認められなかった[資料 4.3: 6] [資料 4.3: 7] [資料 4.3: 8]。そこで、ICH M3 (R2)の「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に関する質疑応答集（Q&A）の「配合剤のための毒性試験」の質問 9 に従い、エルバスビル、リバビリン及びソホスブビルの非臨床併用投与毒性試験は実施しなかった。

Confidential

2.6.6.B.8.7.4　その他の試験

2.6.6.B.8.7.4.1　エルバスビル静脈内投与用製剤の In vitro 溶血性試験（TT#[redacted]-7800）

[資料4.2.3.7.7.7: TT#[redacted]-7800]

ヒトの ADME 試験のために、エルバスビルの静脈内投与用製剤の溶血性試験を実施した（TT#[redacted]-7800）[2.6.7.B.17 項]。エルバスビル製剤［0.1 mg/mL のエルバスビル、媒体として脱イオン水中に15%（w/w）ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、0.075%（v/w）L-乳酸、0.5%（v/w）エタノール、0.3125%（v/w）1N NaOH（脱イオン水に溶解）を含有］及びその媒体（プラセボ）について、ヒト全血を用いて in vitro 溶血性を評価した。

プラセボについて、試験した全希釈濃度（1:1～1:512）でヒトの全血に対し溶血性は認められなかった。エルバスビルについても試験した全濃度（0.01～0.00002 mg/mL）でヒトの全血に対し溶血性は認められなかった。

以上の結果から、本試験で用いたエルバスビル製剤は、検討した全濃度で、ヒト全血に対し溶血性はないと考えられた。

Confidential

2.6.6.9　考察及び結論

グラゾプレビルはHCVの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り、エルバスビルはHCV NS5Aに対する低分子阻害薬である。HCV GT1、3及び4慢性感染患者を対象に開発されたグラゾプレビル／エルバスビルの併用療法は高い有効性と良好な忍容性を有し、簡便（1日1回投与）で、ペグインターフェロンを使用しない短期投与レジメンが可能である。HCV GT1感染患者に対してはグラゾプレビル／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／エルバスビルの臨推奨床用量は、100 mg/50 mgである。母集団薬物動態解析による日本人HCV感染患者（MK-5172-058試験）の定常状態におけるグラゾプレビル及びエルバスビルの血漿中曝露量の個別推定値に基づく$AUC_{0\text{-}24\ hr}$の幾何平均値は、それぞれ、4.438 μM·hr及び2.775μM·hr であり、対応する C_{max} 値は、0.617 μM 及び0.177 μM であった[2.7.2.3.1.1 項、2.7.2.3.2.1 項]。

グラゾプレビル及びエルバスビル単独の毒性試験については、標準的な組合せのin vitro及びin vivo遺伝毒性試験、ラットで最大6ヵ月及びイヌで最大9ヵ月までの反復経口投与毒性試験並びに、一連の生殖発生毒性試験が実施されている。CD1マウス及び／又は rasH2野生型マウスの用量設定試験を実施して、それぞれのマウスを用いて実施する可能性のあった短期又は長期がん原性試験での投与量を検討したが、臨床で予定されるグラゾプレビル／エルバスビルの併用連続投与期間が6ヵ月未満であり、慢性あるいは再発性の病態の治療において間欠的な方法で頻繁に用いられるものではなく、標準的な組合せの遺伝毒性試験でいずれの遺伝毒性も認められず、慢性毒性試験で増殖性の徴候も認められなかったことから、ICH S1Aガイダンスに従って、グラゾプレビル／エルバスビルのがん原性試験は実施しなかった。臨床試験（PN003試験）[資料5.3.5.1.2: 5172P003]において、高用量のグラゾプレビルをペグインターフェロン及びリバビリンと併用投与した患者の一部で、遅発性のトランスアミナーゼ上昇がみられたことから、異なる系統のマウスを用いたグラゾプレビルの単独投与探索試験をさらに実施した。これら試験では、マウスの用量設定試験（高用量でトランスアミラーゼ上昇を示した唯一の動物種）でみられた肝胆道系の変化を、更に詳しく調べられるようにデザインした。エルバスビル単独でイヌに1ヵ月間経口投与し、その後3ヵ月間休薬期間を設けた試験を実施し、イヌの反復投与毒性試験においてエルバスビル投与と関連してリンパ系組織内にみられたリン脂質症の回復性について評価した。グラゾプレビル／エルバスビル併用に対する安全性は、イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験により評価した。非臨床試験において、標的器官は異なるものの、イヌはグラゾプレビル又はエルバスビルの投与時に病理組織学的変化の認められた動物種であった。

ICHガイドラインに従って実施した、標準的な組合せのin vitro又はin vivo試験［細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames試験）、染色体異常試験及びラット骨髄のin vivo小核試験］において、グラゾプレビルに遺伝毒性は認められなかった。最高用量は、in vitro遺伝毒性試験については限界用量又は細胞毒性により制限された用量とし、in vivo遺伝毒性試験については限界用量、又は到達可能な最大曝露量が得られる用量とした。

グラゾプレビルの毒性プロファイルは、反復投与毒性試験（ラット／イヌの毒性試験を含む）、

Confidential

rasH2野生型マウス／CD1マウスの用量設定試験、ラット、イヌ又は様々な系統のマウスを用いた毒性発現機序試験において検討した。ラット慢性毒性試験に用いた最高用量は、到達可能な最大曝露量が得られる用量であり、イヌ慢性毒性試験及びマウス用量設定試験に用いた最高用量は、MTD を超えていた。ラット／イヌ慢性毒性試験及びマウス用量設定試験から得られた NOAEL に基づいて安全域を算出した。安全域の概要を[表 2.6.6- 4]に示す。

表 2.6.6- 4　グラゾプレビルの全身曝露量に基づいた安全域

	NOAEL mg/kg/day	Toxicokinetic Values at NOAEL		Safety Margins to the Clinical Dose[a]	
		$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ μM·hr	C_{max} μM	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$	C_{max}
Mouse (rasH2 wild-type) (1 month)[b]	100	164	40.8	37X	66X
Mouse (CD1)(ICR) (3 months)[c]	200	820	56.3	185X	91X
Rat (6 months)[d]	200 b.i.d.	445	32.8	100X	53X
Dog (9 months)[e]	15	367	34.4	83X	56X

a　Calculations based on ratio of daily exposure ($AUC_{0\text{-}24\ hr}$) and C_{max} in nonclinical species to the respective daily exposure ($AUC_{0\text{-}24\ hr}$) and C_{max} in Japanese HCV-infected patients at the recommended daily clinical dose of grazoprevir, 100 mg, when co-administered with elbasvir, 50 mg.　The $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ and C_{max} in Japanese HCV-infected patients are the geometric mean steady state $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ and C_{max} calculated from individual estimates by population PK analysis respectively from clinical protocol MK-5172-P058.
b　Study TT#[redacted]-6034 [Sec.2.6.7.A.7A].
c　Study TT#[redacted]-6038 [Sec.2.6.7.A.7B].
d　Study TT#[redacted]-6014 [Sec.2.6.7.A.7E].
e　Study TT#[redacted]-6015 [Sec.2.6.7.A.7G].
b.i.d.= Bis in die.

ラットにおいて、グラゾプレビルの血漿中全身曝露量が最大になる用量（200 mg/kg b.i.d.）まで投与しても、忍容性は良好であった。この用量での曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 445 μM·hr）は、HCV 感染患者に100 mg のグラゾプレビルを投与したときの約100倍の曝露量に相当する。用量制限毒性（概して体重減少が先行する病的状態又は死亡）は、イヌ及びマウス（rasH2野生型及び CD1マウス）で試験した最高用量（イヌで300 mg/kg/日及びマウスで500 mg/kg/日）で認められた。イヌに300 mg/kg/日を投与したときの血漿中全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 2620 μM·hr）は、HCV 感染患者に100 mg のグラゾプレビルを投与したときの約590倍の曝露量に相当する。rasH2野生型及び CD1マウスにおいて、500 mg/kg/日を投与したときの血漿中全身曝露量（rasH2野生型及び CD1マウスにおいてそれぞれ $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 2810 μM·hr 及び1470 μM·hr）は、HCV 感染患者に100 mg のグラゾプレビルを投与したときのそれぞれ約633倍と約331倍の曝露量に相当する。

グラゾプレビルの標的器官は、肝胆道系（マウス、ラット及びイヌ）、雄性生殖器（マウス及びイヌ）、消化管（マウス、ラット及びイヌ）、腎臓（マウスのみ）及び脾臓／骨髄（イヌのみ）であった。これら器官で認められた所見は、その性質（炎症、変性／壊死のいずれの所見も伴わない）及び程度から毒性学的意義は限定的であると考えられ、その高い安全域（＞35倍）から、ヒ

Confidential

ト曝露量においては外挿性のないものと考えられた。

- 肝胆道系

ラットにおける肝胆道系の変化は、200 mg/kg/日（HCV 感染患者に投与したときの約83倍の曝露量）以上で認められた総ビリルビンのごく軽度な増加に限定されていた。この変化の程度は小さく（2倍以下）、肝毒性を示す他のバイオマーカー（AST、ALT 又は ALP 増加）に変化がみられないこと、本所見に関連する病理組織学的な変化が認められていないことから、本所見の毒性学的意義は低いと考えられた。よって、本試験における胆道系の変化に関する NOAEL は200 mg/kg b.i.d.（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約100倍の曝露量に相当）であった。

イヌの肝胆道系の変化は15 mg/kg/日（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約83倍の曝露量に相当）以上の投与により認められた。300/100 mg/kg/日（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約518倍の曝露量に相当）を投与したとき、ビリルビンの中等度～重度の増加（主に直接ビリルビン）、血清 ALP 及び尿中ビリルビンの軽度の増加、糞便と一部組織（皮膚、眼、歯肉粘膜、白色脂肪組織、大動脈）の黄色化、胆汁の増加を伴う胆嚢の拡張（300 mg/kg/日群の早期屠殺した動物で認めた。病理組織学的検査で関連した変化なし）、肝重量の増加（病理組織学的検査で関連した変化なし）、病理組織学的検査による類洞細胞におけるごく軽度～軽度の色素沈着（ヘモジデリン）、並びに大型胆管及び胆嚢内腔におけるごく軽度の微石症（組織自体の変化なし）が認められた。15 mg/kg/日の投与による変化は、ごく軽度～軽度のビリルビン増加（雌雄）、及び大型胆管及び胆嚢内腔におけるごく軽度の微石症（雌1例、組織自体の変化なし）であった。ビリルビン増加については、変化の程度は小さく（3倍以下）、肝毒性を示す他のバイオマーカー（AST、ALT 又は ALP 増加）に変化がみられないこと、本所見に関連する病理組織学的な変化が認められていないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。大型胆管及び胆嚢内腔でみられた微石症はごく軽度なものであり、組織自体に病理組織学的な変化が認められていないことから、本所見の毒性学的意義は低いと考えられた。さらに、この微石症の程度は、用量の増量によってもごく軽度のまま変わらなかった。よって、肝胆道系の変化の NOAEL は15 mg/kg/日であった（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約83倍の曝露量に相当）。また、イヌの肝胆道系について NOEL であった5 mg/kg/日でも、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときと比較して高い曝露（約16倍）が得られた。

rasH2野生型及び CD1マウスでは、100 mg/kg/日以上で肝胆道系の変化が認められた（rasH2野生型及び CD1マウスで、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときのそれぞれ約37倍及び約102倍の曝露量に相当）。用量に関連したビリルビン（主に直接ビリルビン）の増加が、両系統の100 mg/kg/日以上の用量で認められた（100 mg/kg/日ではごく軽度～軽度、500 mg/kg/日では重度まで）。また AST 及び ALT の用量に関連した増加が200 mg/kg/日以上で認められた（500 mg/kg/日では最高で中等度）。さらに ALP の用量に依存した増加が、200 mg/kg/日以上で認められた（ごく軽度）。血清生化学的検査の変化は投与期間とともに増悪することはなく、CD1マウスに比べて rasH2野生型でおおむね高度であり、12週間の回復期間を設けた rasH2野生型マウスの12週間探索的試験において、回復性があることが確認された。肝臓の変化が、100 mg/kg/日以上を投与した

Confidential

rasH2野生型マウス及び200 mg/kg/日以上を投与した CD1マウスに認められ、胆嚢の変化が200 mg/kg/日以上を投与した rasH2野生型マウス及び500 mg/kg/日を投与した CD1マウスにおいて認められた。肝臓の変化は、重量の増加（100 mg/kg/日以上を投与した rasH2野生型マウス、200 mg/kg/日を投与した CD1マウス）、肝細胞サイズの増大（500 mg/kg/日では肝臓サイズの増大とほぼ相関）、門脈周囲部における肝細胞細胞質の軽度の淡明化（PAS 染色及び TEM により確認された肝細胞におけるグリコーゲン量の増加と一致、200 mg/kg/日以上を投与した両系統のマウス）であった。肝臓の炎症、変性／壊死を示す病理組織学的所見は認められなかった。マウスで認められたこの肝臓の変化は、投与期間に伴って重症化はせず、rasH2野生型マウスを用いた12週間探索的試験において12週間回復期間中に回復した。胆嚢の変化は、限局性の炎症（200 mg/kg/日以上を投与した rasH2野生型マウス、500 mg/kg/日を投与した CD1マウス）で、rasH2野生型マウスでは500 mg/kg/日を約8週間投与した後、上皮の過形成に進行した。このような胆嚢の変化は CD1マウスに比べて rasH2野生型でおおむね顕著であった。さらに、12週間の回復期間を設けた rasH2野生型マウスの12週間探索的試験において、回復性があることが確認された。全体として、100 mg/kg/日を投与した rasH2野生型マウスで認められた臨床病理学的変化及び肝重量の増加、並びに200 mg/kg 日を投与した CD1マウスで認められた臨床病理学的変化及び肝細胞サイズの増大（門脈周囲部における肝細胞細胞質の軽度の淡明化、並びに平均肝重量の増加を伴う）などの肝胆道系の変化は軽微であり、有害なものとは思われなかった。よって、肝胆道系の変化に関する NOAEL は、rasH2野生型マウスでは100 mg/kg/日（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約37倍の曝露量に相当）、CD1マウスでは200 mg/kg/日（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約185倍の曝露量に相当）であった。

rasH2野生型マウスの親系統である C57BL/6及び BALB/c マウスを用い、肝胆道系の変化に対するマウス系統の感受性を検討した。マウスはトランスアミナーゼの増加が認められた唯一の動物種で、rasH2野生型マウスはこの変化に最も感度の高い系統であった。臨床試験（PN003試験）[資料5.3.5.1.2: 5172P003]において、高用量のグラゾプレビルをペグインターフェロン及びリバビリンと併用投与した患者の一部で、遅発性のトランスアミナーゼ上昇がみられたことから本試験を実施した。検討した用量は、200 mg/kg/日及び500 mg/kg/日であった。既に実施した試験で rasH2野生型及び CD1マウスにおいて認められたものとほぼ同様の肝胆道系の変化が、両系統の両用量において認められたが、限局性の肝壊死は200 mg/kg/日及び500 mg/kg/日を投与した BALB/c マウスのみで認められた。本所見の原因は不明ではあるが、BALB/c マウスの肝胆嚢中グラゾプレビル濃度が高いために引き起こされたものではなかった。さらに、BALB/c マウスではいずれの用量でも AST の増加はみられず、ALT の増加も500 mg/kg/日群の雄でのみみられたことから、200 mg/kg/日以上を投与した BALB/c マウスの雌雄でみられた限局性肝壊死は、AST 又は ALT の増加と関連しなかった。

主にイヌ及びマウスで認められた肝胆道毒性の機序は不明であるが、毒性発現機序に関する試験で認められたグラゾプレビル投与に関連した血清胆汁酸の変化と、トランスアミナーゼの増加を含む肝臓変化との間に関連があるとは考え難い。血清胆汁酸の増加を示したイヌにおいて、肝臓の炎症又は壊死、並びにトランスアミナーゼの増加はみられず、限局性肝壊死を示した BALB/c

Confidential

マウスの雌において、血清胆汁酸の増加はみられなかった。

毒性発現機序に関する試験で認められたグラゾプレビルに関連した血清胆汁酸の変化と、非臨床試験での胆道毒性との関連性は否定できない。血清胆汁酸の変化を認めたマウス及びイヌは、胆嚢又は胆管の病理組織学的変化や総／直接血清ビリルビンの顕著な増加が観察された動物種である。さらに、グラゾプレビルの主な排泄経路は胆汁排泄であるため[2.6.4.A.6 項]、胆汁中の高濃度のグラゾプレビルが胆道系の病理組織学的変化（イヌの胆管及び胆嚢における微石症並びにマウスにおける胆嚢の炎症／過形成）に寄与している可能性も除外できない。

全体として、イヌ及びマウスでみられた肝胆道毒性に関しては、NOAEL での高い安全域（イヌで約83倍、マウスで約37倍）から、ヒトでのグラゾプレビル投与量（100 mg）においてヒトでのリスクとする外挿性がないと考えられた。

- <u>雄性生殖器</u>

ラットにおいて、到達可能な最大曝露量となる投与量（200 mg/kg b.i.d.、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約100倍の曝露量に相当）まで最長6ヵ月間投与しても、雄性生殖器に変化はみられなかった。

イヌでは、9ヵ月間毒性試験で15 mg/kg/日（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約83倍の曝露量に相当）以上を投与したとき、及び1ヵ月間毒性試験で600 mg/kg/日（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約660倍の曝露量に相当）を投与したときに、雄性生殖器に病理組織学的変化がみられた。観察された所見は、精巣重量の減少と関連した精細管の変性（用量依存性あり）及び、300/100 mg/kg/日以上で特に影響を受けた動物では精巣上体管に変化はみられないものの管腔での精子数の減少であった。15 mg/kg/日で、精巣における所見が雄1例でのみ認められた。これはごく軽度なものであり、精原細胞より成熟した精子のみの減少がみられる一方、セルトリ細胞及びライディッヒ細胞に顕著な変化は認められなかった。精巣上体では、病理組織学的な変化は認められず、また光学顕微鏡下で精巣上体における精子数にも影響はみられなかった。よって、ごく軽度の所見であったこと、さらに回復性が予想されることから[資料4.3: 1]、15 mg/kg/日でみられた精巣の変化の毒性学的意義は低いと考えられた。ゆえに、雄性生殖器の変化の NOAEL は15 mg/kg/日であった（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約83倍の曝露量に相当）。また、イヌの雄性生殖期器について NOEL であった5 mg/kg/日でも、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときと比較して高い曝露量（約16倍）であった。

rasH2野生型マウスで12週間の回復期間を設けた探索的12週間毒性試験において、500 mg/kg/日のグラゾプレビル（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約633倍の曝露量に相当）を12週間投与したとき精巣重量の減少がみられたが、200 mg/kg/日（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約75倍の曝露量に相当）ではみられなかった。精巣重量の減少は、投与12週で剖検したマウスでのみ認められ、投与8週以前で剖検したマウスでは認められなかった。12週間の回復期間後には精巣重量の減少はみられず、この変化に回復性があることが示された。本探索的試験の目的は、先に実施した同系統マウスの短期試験（1ヵ月）で認められた肝胆道系変化について探索することであったため、12週間投与した後の雄性生殖器の病理組織学的検査は実施

Confidential

しなかった。しかし、500 mg/kg/日までのグラゾプレビルを1ヵ月間投与した rasH2野生型マウス（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約633倍の曝露量に相当）、又は500 mg/kg/日までのグラゾプレビルを3ヵ月間投与した CD1マウス（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約331倍の曝露量に相当）において、雄性生殖器の重量の変化及び病理組織学的変化はみられなかった。

雄性生殖器に対する毒性の原因は不明であるが、その高い安全域（イヌで約83倍、rasH2野生型マウスで約75倍）から、ヒトでのグラゾプレビル推奨用量（100 mg）においてヒトへの外挿性はないと考えられる。テラプレビル（Incivek™、第一世代の HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害剤）[資料4.3: 5]又はボセプレビル（Victrelis™、別の第一世代の HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害剤）[資料4.3: 2]を投与したラットにおいて、変性性の精巣毒性が観察されている。テラプレビル又はボセプレビルのヒトでの推奨用量（それぞれ750 mg 1日3回及び800 mg 1日3回）を投与したときのヒト曝露量と比較して、NOAEL での曝露量は1倍未満となっている。しかし、このように低い安全域にもかかわらず、それぞれの薬剤に関する臨床モニタリングからヒト被験者の精巣毒性は確認されていない。

- 消化管

非臨床動物種における消化管の変化は高用量群でのみ認められ、グラゾプレビルの局所的な影響によるものと考えられた。ラット分布試験では消化管に高濃度のグラゾプレビルが認められたが[2.6.4.A.4.1 項]、これはグラゾプレビルの経口バイオアベイラビリティが低いこと（未吸収の化合物）、及びグラゾプレビルの主要排泄経路が胆汁排泄であることが原因と考えられた[2.6.4.A.6 項]。したがって、この局所変化の安全域は、臨床推奨用量（ヒト体重を60 kg と仮定）に対する用量の倍数として表記した。

ラットでは、腺胃粘膜において限局性出血が、200 mg/kg b.i.d.群［臨床推奨用量（100 mg）の240倍、ヒト体重を60 kg として mg/kg に換算］の雄でのみみられた。200 mg/kg b.i.d.群の全身曝露量は雌雄で同程度であり、更に、200 mg/kg/日群の全身曝露量とも同程度であることから、この限局性出血は、200 mg/kg の1日2回投与により胃粘膜へのグラゾプレビルの直接接触時間が長くなったためと考えられた。性差に関しては、200 mg/kg b.i.d.群において、雄が雌よりも体重が重いため、より大量の投与液を投与されたためと考えられた。200 mg/kg/日［臨床推奨用量（100 mg）の120倍、ヒト体重を60 kg として mg/kg に換算］以下では消化管の所見はみられなかった。

イヌでは、300 mg/kg/日群［臨床推奨用量（100 mg）の180倍、ヒト体重を60 kg として mg/kg に換算］の1例に、被験物質の局所作用と考えられる十二指腸の限局性炎症がみとめられた。100 mg/kg/日群［臨床推奨用量（100 mg）の60倍、ヒト体重を60 kg として mg/kg に換算］の消化管の所見は、嘔吐及び軟便／液状便のみであった。

マウスの消化管の所見は、rasH2野生型マウスを用いた1ヵ月間試験、C57BL/6及び BALB/c を用いた1ヵ月間試験、及び、rasH2野生型マウスを用いた12ヵ月間の回復期間を設けた12週間試験において認められた。所見の多くは十二指腸に限局したものであり、絨毛の萎縮が500 mg/kg/日群で、上皮の空胞化が200 mg/kg/日［臨床推奨用量（100 mg）の120倍、ヒト体重を60 kg として mg/kg

Confidential

に換算］以上の群でみられた。これらの上皮変化は、空腸でみられることはまれであったため、投薬の局所作用に関連する可能性が考えられた。小腸の他の部位（回腸）及び大腸（盲腸、結腸）にはこの所見はみられなかった。空腸以降の腸管でも腸血流があるため細胞間の薬物濃度は十二指腸と同様のはずであるが、胆汁流入部位から遠位であるため腸管内濃度が低くなると考えられ、この理由で被験物質の局所的な刺激性が裏付けられると考えられた。さらに、12週間の回復期間を設けた探索的な12週間毒性試験における rasH2野生型マウスの腸変化は、投与期間中、概してその発症率及び程度ともに時間経過と関連せずに認められ、12週の回復期間終了時に回復がみられた。1ヵ月間経口投与用量設定試験では100 mg/kg/日［臨床推奨用量（100 mg）の60倍、ヒト体重を60 kg として mg/kg に換算］以下の用量で消化管の変化はみられなかった。

結論として、ラット、イヌ及びマウスで認められた消化管の変化は、被験物質の局所刺激性によるものと考えられ、その高い安全域［ラット、イヌ及びマウスで、臨床推奨用量（100 mg）のそれぞれ120倍、60倍及び60倍、ヒト体重を60 kg として mg/kg に換算］から、ヒトへの外挿性はないと考えられる。

- 腎臓

腎臓の変化は、rasH2野生型マウス及び CD1マウス試験でのみ認められた。観察された所見は、MTD を超えた用量の500 mg/kg/日（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの曝露量と比較して rasH2野生型マウス及び CD1マウスでそれぞれ約633倍及び約331倍の曝露量に相当）でみられた、腎尿細管上皮の変性であった。腎臓の変化の NOEL は200 mg/kg/日であった（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの曝露量と比較して rasH2野生型マウス及び CD1マウスでそれぞれ約75倍及び約185倍の曝露量に相当）。

- 脾臓／骨髄

脾臓／骨髄の変化は、イヌの9ヵ月毒性試験でみられた300/100 mg/kg/日（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約518倍の曝露量に相当）以上での脾臓の色素沈着（ヘモジデリン）の亢進、髄外造血の増加、赤血球系又は骨髄系細胞の過形成であった。脾臓／骨髄の変化の NOEL は15 mg/kg/日であった（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約83倍の曝露量に相当）。

生殖毒性試験において、ラットに到達可能な最大曝露量が得られる用量（200 mg/kg b.i.d.、同用量を投与したラットの1ヵ月毒性試験の投与4週での TK の結果から、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約48倍の曝露量に相当）まで投与しても、雌雄の受胎能パラメータに変化はみられなかった。器官形成期の妊娠ラットに、到達可能な最大曝露量が得られる用量（200 mg/kg b.i.d.、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約49倍の曝露量に相当）までのグラゾプレビルを投与しても、また妊娠ウサギに母動物最大耐量（100 mg/kg/日、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約17倍の曝露量に相当）までを投与しても催奇形性はみられなかった。器官形成期及び授乳期の妊娠ラットに、到達可能な最大曝露量が得られる用量

Confidential

（100 mg/kg/日、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの約35倍の曝露量に相当）までのグラゾプレビルを投与しても、ラット F_1世代に影響はみられなかった。

全体として、グラゾプレビルの毒性プロファイルは、ラット、イヌ及びマウスにおいて十分に特徴づけられており、各動物種の標的器官が特定されている。これらの非臨床動物種で確認された毒性は、高い安全域（>35倍）を有することから、HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときのヒト曝露量において、外挿性はないものと考えられた。

遺伝毒性試験として、ICH ガイドラインに従って標準的な組合せの in vitro 又は in vivo 試験［細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）、染色体異常試験及びラット骨髄の in vivo 小核試験］を実施した結果、エルバスビルに遺伝毒性は認められなかった。In vitro 遺伝毒性試験の最高用量は、限界用量又は最大溶解量とし、in vivo 遺伝毒性試験の最大投与量は、限界用量よりも高い用量（1000 mg/kg b.i.d.。1日総投与量2000 mg/kg）とした。

エルバスビルの毒性プロファイルは、ラット及びイヌの反復投与毒性試験、並びに rasH2野生型マウスの用量設定試験において検討した。非臨床試験におけるエルバスビルの経口投与調製物について、ポリソルベート80／ビタミン E TPGS を含有する調製物や HPMCAS-LF/HPMCP を含有する非晶質分散体調製物などの調製物について検討した結果、ポリソルベート80に溶解したエルバスビルを経口投与したときに最高の全身曝露が得られた。したがって、毒性試験では、5%又は10%（w/w）ポリソルベート80水溶液にエルバスビルを溶解させた投与液を用いた。反復投与毒性試験の高用量の設定は、ICH M3 (R2)ガイダンスに従って、一般的に限界用量とされる1000 mg/kg/日を採用した。ラット及びイヌにおいて、1000 mg/kg/日までのエルバスビルの忍容性は全般的に良好であった。投薬に関連した病理組織学的変化は、イヌのリンパ組織で認めたごく軽度～軽度のリン脂質症（毒性学的意義は低く回復性あり）のみであった。ラット／イヌ慢性毒性試験で得られた NOAEL より算出した安全域を、[表 2.6.6- 5］に示す。

Confidential

表 2.6.6- 5　エルバスビルの全身曝露量に基づいた安全域

	NOAEL mg/kg/day	Toxicokinetic Values at NOAEL		Safety Margins to the Clinical Dose[a]	
		$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ μM·hr	C_{max} μM	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$	C_{max}
Mouse (rasH2 wild-type) (1 month)[b]	1000	151	9.17	54X	52X
Rat (6 months)[c]	1000	21.9	1.54	8X	9X
Dog (9 months)[d]	1000	16.6	1.31	6X	7X

a　Calculations based on ratio of daily exposure ($AUC_{0\text{-}24\ hr}$) and C_{max} in nonclinical species to the respective daily exposure ($AUC_{0\text{-}24\ hr}$) and C_{max} in Japanese HCV-infected patients at the recommended daily clinical dose of elbasvir, 50 mg, when co-administered with grazoprevir, 100 mg.　The $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ and C_{max} in Japanese HCV-infected patients are the geometric mean steady state $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ and C_{max} calculated from individual estimates by population PK analysis respectively from clinical protocol MK-5172-P058.
b　Study TT#[redacted]-6047 [Sec.2.6.7.B.6].
c　Study TT#[redacted]-6033 [Sec.2.6.7.B.7D].
d　Study TT#[redacted]-6030 [Sec.2.6.7.B.7G].

マウスでは、実施予定であった rasH2トランスジェニックマウスの短期がん原性試験での用量を検討するため、rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験を実施した。最高用量である1000 mg/kg/日（HCV 感染患者にエルバスビルを投与したときの約54倍の曝露量に相当）まで、投薬に関連した変化はみられなかった。

ラットでは、14日間経口投与毒性試験の最高用量を1000 mg/kg b.i.d.としたが、3及び6ヵ月間経口投与毒性試験の最高用量は1000 mg/kg/日とした。未吸収の被験物質の糞便中排泄を示唆する糞便の白色化が1000 mg/kg b.i.d.群でみられたことから、エルバスビルの経口バイオアベイラビリティには上限があると考えられ、1000 mg/kg b.i.d.群と1000 mg/kg/日群の曝露量がほぼ同様であった。ラット試験では30 mg/kg/日から1000 mg/kg/日までの用量を検討した。1000 mg/kg b.i.d.群では糞便の白色化の他、好中球及びコレステロールのごく軽度又は軽度増加が、300 mg/kg/日以上の群で摂餌量の減少に続く体重増加量の減少が、30 mg/kg/日以上の群で流涎及び尿量の増加（尿比重の減少を伴う）がみられた。これらの変化に関して、その程度はごく軽度～軽度であり、すべての試験において一貫して投薬に関連するとは言えず、動物の一般状態に大きく影響するものではなく、病理組織所見を伴わなかった。したがって、これらの毒性学的意義は低いと考えられた。よって、ラットにおける NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。本用量における全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ = 21.9 μM·hr）は、HCV 感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約8倍に相当する。

イヌでは、1000 mg/kg/日でみられた投薬に関連した変化は、糞便の白色／薄茶色化（吸収されずに糞便中に排泄された被験物質に起因するものと考えられた）、嘔吐（散発性）、並びに摂餌量減少（時折）に伴う一過性の体重減少［稀に二次的な一般状態の変化（皮膚緊張の低下及び痩せた外観）を伴った］であった。イヌでみられたこれらの所見は、動物の一般状態に大きく影響するものではなく、剖検時の肉眼所見及び病理組織所見を伴わず、1ヵ月間投与後に3ヵ月間の回復期間を設けた試験において投与終了後ただちに回復した。したがって、これらの変化の毒性学的

Confidential

意義は低いと考えられた。1ヵ月間以上投与した試験の病理組織学的検査では、胃、小腸（パイエル板）及び大腸の消化管関連リンパ系組織、リンパ節あるいは胆嚢の孤立リンパ小節における、ごく軽度～軽度のリン脂質症が25 mg/kg/日以上の群で、並びに脾臓におけるリン脂質症が1000 mg/kg/日群でみられた。リンパ系組織にリン脂質症に伴った他の変化（特にリンパ様細胞の減少又は炎症／壊死）はみられず、さらに血液学的検査でも変化（白血球数又はリンパ球数の減少、循環血球の異常など）は認められなかった。変化の程度はごく軽度から軽度であり、発生率及びその程度は1ヵ月試験と9ヵ月試験で同様であった。

イヌの毒性試験でみられたリンパ系組織におけるリン脂質症は、その程度が軽度であったこと、リンパ系組織に毒性がみられていないこと（すなわち、リンパ様細胞の減少、炎症又は壊死が認められていないこと）、又は血液学的検査で投薬に関連した変化が認められていないこと（すなわち、白血球数又はリンパ球数の減少、循環血球に異常がみられないこと）から、毒性学的意義は低いと考えられた。リンパ系組織内の空胞化の程度は、短期試験と長期試験を比較しても増強はみられなかったこと、リン脂質症から生じる明らかな機能変化及び病理組織学的変化はみられないことから示されるように、長期曝露を実施しても重要な毒性を示されなかったこと、さらに3ヵ月休薬期間を設けたイヌの1ヵ月毒性試験において回復性が示されていることは重要である。よって、イヌにおける NOAEL は、1000 mg/kg/日（HCV 感染患者にエルバスビルを投与したときの約6倍の曝露量に相当）以上であった。

多くの既承認薬では実験動物において、またいくつかの薬ではヒトにおいて、リン脂質症が観察されている。In vivo 又は ex vivo 動物試験でリン脂質症と毒性を関連づける証拠はほとんどなく、ヒトのリン脂質症と臨床毒性を関連付ける証拠もない[資料4.3: 3]。例えば、ロラタジン（Claritin™、季節性及び通年性アレルギー性鼻炎に関連する症状を緩和する既承認の持続性ヒスタミン H1受容体拮抗薬）は、ラット及びサルに可逆的なリン脂質症を誘起した。しかし、ヒトにロラタジン40 mg/kg/日を3ヵ月間投与した試験において、リン脂質症の発現は認められていない[資料4.3: 4]。

イヌの毒性試験でみられたライソソームのリン脂質蓄積について、その病因は不明である。しかし、エルバスビルは、リン脂質症を誘起することが知られている陽イオン性両親媒性薬物と共通した物理化学的特性を有している。エルバスビルは親水基及び疎水基をそれぞれ1つずつ有し、酸性下で正に荷電していると考えられる[3.2.S.1.2項（エルバスビル）]。標的器官は消化管関連リンパ系組織及びリンパ節、並びに胆嚢の孤立リンパ小節であり、これらの器官でエルバスビルの濃度が高いことは、エルバスビルの経口アベイラビリティが低いこと（未吸収の被験物質がみられた）、及びエルバスビルの主要排泄経路が腸又は胆汁排泄であることと一貫している[2.6.4.B.6.3項]。このようにエルバスビルの濃度が局所的に高いことが、これらの器官に影響を及ぼしている可能性がある。したがって、この局所変化の安全係数は、臨床用量（ヒト体重を60 kg と仮定して mg/kg に換算）に対する用量の倍数として算出した。イヌに最大9ヵ月間投与しても、5 mg/kg/日以下ではこれらの器官にリン脂質症はみられなかった。本用量は、臨床用量（50 mg すなわち0.8 mg/kg）の6倍に相当する。さらに、最高用量の1000 mg/kg/日群においてのみ、脾臓に軽度なリン脂質症がみられた。脾臓のリン脂質症に関する NOEL は25 mg/kg/日であり、そのときの全身

Confidential

曝露は、HCV 感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約2倍に相当する。

ラットの生殖発生毒性試験において、1000 mg/kg/日群の雄で、精巣上体尾部1 g 当たりの精子数のごく軽度の減少（対照群と比較して14%の減少）が認められた。しかし、生殖成績、受胎能、胚／胎児生存率、平均精巣重量及び精子の運動性などのいずれの生殖パラメータに投与に関連した影響はみられず、ラット及びイヌの反復投与毒性試験において精巣の病理組織学的な変化もみられなかったことから、本精子数の減少の毒性学的意義は低く、雌雄の受胎能に関する NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった（ラットの3ヵ月毒性試験の投与13週での TK 結果に基づき、HCV 感染患者にエルバスビルを投与したときの約6倍の曝露量に相当）。器官形成期の妊娠ラット又は妊娠ウサギに、エルバスビルを限界用量の1000 mg/kg/日（HCV 感染患者にエルバスビルを投与したときの全身曝露量のそれぞれ約8倍及び約14倍に相当）まで投与しても、催奇形性はみられなかった。器官形成期及び授乳期の妊娠ラットにエルバスビルを限界用量の1000 mg/kg/日（ラットの胚・胎児発生に関する試験の TK 結果に基づき、HCV 感染患者にエルバスビルを投与したときの全身曝露量の約8倍に相当）まで投与しても、ラット F_1世代に投薬に関連した変化はみられなかった。ラットの母動物では、1000 mg/kg/日群で体重増加量及び摂餌量の減少がみられた。これらの変化は軽度であり、すべての生殖発生毒性試験で一貫してみられたわけではなかった。したがって、母動物の NOAEL はラット及びウサギにおいて1000 mg/kg/日以上であり、ウサギでは NOAEL が NOEL でもあった。

全体として、ラットの6ヵ月間まで及びイヌの9ヵ月間までの試験において、エルバスビルの忍容性は良好であった。唯一認められた顕著な病理組織学的変化は、イヌでのみリンパ系組織でみられたごく軽度から軽度の、有害ではなく回復性のあるリン脂質症であった。これらの組織で他の影響はなく、血液学的パラメータにも変化は認められなかった。ラット又はマウスの反復投与毒性試験において、イヌと同程度以上の曝露量が見込める投与量を投与しても、リン脂質症はみられなかった。

グラゾプレビル及びエルバスビルをそれぞれ単独投与したときの非臨床安全性試験の結果より、重複する毒性所見又はグラゾプレビル／エルバスビル併用に関して懸念すべき事項は特に認められなかった。イヌの1ヵ月間グラゾプレビル／エルバスビル併用毒性試験を実施し、エルバスビル／グラゾプレビルを5/25 mg/kg/日で併用投与したところ、相加的又は相乗的な毒性の増強、又は、トキシコキネティクス的相互作用はみられなかった。本用量でのイヌにおける全身曝露量は HCV 感染患者にグラゾプレビル／エルバスビルを併用投与したときの曝露量の約14/3倍に相当する。

結論として、グラゾプレビル及びエルバスビルの毒性プロファイルは、慢性 HCV 感染に対する治療法としてグラゾプレビル（100 mg）とエルバスビル（50 mg）併用療法の安全性を裏付けるものであった。

Confidential

参考文献一覧

[資料4.3: 1]　Creasy DM. Pathogenesis of male reproductive toxicity. Toxicol Pathol. 2001; 29: 64-76.

[資料4.3: 2]　USA VICTRELIS™(boceprevir) capsules: 2011.

[資料4.3: 3]　Reasor MJ, Hastings KL, Ulrich RG. Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. Expert Opin Drug Saf. 2006; 5: 567-83.

[資料4.3: 4]　UK Product Summary:　Loratadine 10 mg Tablets

[資料4.3: 5]　US Prescribing Information: INCIVEK (telaprevir) Film Coated Tablets, for oral use: 2011 - Revised 06/12.

[資料4.3: 6]　Rebetol™: Highlights of prescribing information - Revised 12/2014.

[資料4.3: 7]　Sovaldi™ EMEA procedure No. EMEA/H/C/002798/0000: Assessment report - 21 November 2013

[資料4.3: 8]　Sovaldi™ FDA application number: 204671Orig1s000: Cross discipline team leader review - 2013

Confidential

CTD 第 2 部

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7　毒性試験概要表

MSD 株式会社

目次

頁

A 項：グラゾプレビル 4
2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表 4
2.6.7.A.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 18
2.6.7.A.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表 23
2.6.7.A.4　毒性試験：被験物質（バッチごと）一覧 26
2.6.7.A.5　単回投与毒性試験 34
2.6.7.A.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 35
2.6.7.A.7A　反復投与毒性試験：Ras H2 野生型マウス（交雑系）の1ヵ月間経口投与用量設定試験 40
2.6.7.A.7B　反復投与毒性試験：CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験 49
2.6.7.A.7C　反復投与毒性試験：ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（機能観察総合評価を含む） 57
2.6.7.A.7D　反復投与毒性試験：ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（機能観察総合評価及び投与2週後の中間剖検を含む） 60
2.6.7.A.7E　反復投与毒性試験：ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験 64
2.6.7.A.7F　反復投与毒性試験：イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験 68
2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験：イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験（投与3ヵ月後の中間剖検を含む） 72
2.6.7.A.8A　遺伝毒性試験 – In Vitro：細菌を用いる復帰突然変異試験 84
2.6.7.A.8B　遺伝毒性試験 – In Vitro：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いる染色体異常試験 91
2.6.7.A.9A　遺伝毒性試験 – In Vivo：ラットの小核試験 96
2.6.7.A.9B　遺伝毒性試験 – In Vivo：ラットの小核試験 99
2.6.7.A.10　がん原性試験 101
2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験 102
2.6.7.A.12A　生殖発生毒性試験 – 雌雄ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験（経口投与） 129
2.6.7.A.13A　生殖発生毒性試験 – ラットの胚・胎児発生に関する試験（経口投与） 135
2.6.7.A.13B　生殖発生毒性試験 – ウサギの胚・胎児発生に関する試験（静脈内投与） 139
2.6.7.A.14　生殖発生毒性試験：ラットの出生前及び出生後の発生毒性試験（経口投与） 143
2.6.7.A.15　生殖発生毒性試験 – 出生児（幼若動物）投与／評価試験 149
2.6.7.A.16　局所刺激性試験 150
2.6.7.A.17　その他の毒性試験 151
2.6.7.A.18A　その他の毒性試験：RasH2野生型マウス（交雑系）の12週間経口投与バイオマ

Confidential

ーカー検討試験及び12週間回復性試験 167
2.6.7.A.18B その他の毒性試験：C57BL/6及び BALB/c マウスの1ヵ月間経口投与探索毒性試験 176
2.6.7.A.18C その他の毒性試験：イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験 184
B 項：エルバスビル 188
2.6.7.B.1 毒性試験：一覧表 188
2.6.7.B.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 197
2.6.7.B.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表 200
2.6.7.B.4 毒性試験：原薬 203
2.6.7.B.5 単回投与毒性試験 210
2.6.7.B.6 反復投与毒性試験：非ピボタル試験 211
2.6.7.B.7A 反復投与毒性試験：ラットの14日間経口投与毒性試験（小核試験、機能観察総合評価） 214
2.6.7.B.7B 反復投与毒性試験：ラットの15日間経口投与トキシコキネティクス試験 217
2.6.7.B.7C 反復投与毒性試験：ラットの3ヵ月間経口投与毒性試験 218
2.6.7.B.7D 反復投与毒性試験：ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験 221
2.6.7.B.7E 反復投与毒性試験：イヌの14日間経口投与毒性試験 224
2.6.7.B.7F 反復投与毒性試験：イヌの3ヵ月間経口投与毒性試験 226
2.6.7.B.7G 反復投与毒性試験：イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験 231
2.6.7.B.8 遺伝毒性試験 – In Vitro：非ピボタル試験 236
2.6.7.B.8A 遺伝毒性試験 – In Vitro：細菌を用いる復帰突然変異試験 237
2.6.7.B.8B 遺伝毒性試験 – In Vitro：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いる染色体異常試験 243
2.6.7.B.9 遺伝毒性試験 – In Vivo：非ピボタル試験 248
2.6.7.B.9A 遺伝毒性試験 – In Vitro：ラットの小核試験 249
2.6.7.B.10 がん原性試験 252
2.6.7.B.11 生殖発生毒性試験：非ピボタル試験 253
2.6.7.B.12A 生殖発生毒性試験：雌雄ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験（経口投与） 255
2.6.7.B.13A 生殖発生毒性試験：ラットの胚・胎児発生毒性及びトキシコキネティクス試験（経口投与） 262
2.6.7.B.13B 生殖発生毒性試験：ウサギの胚・胎児発生毒性及びトキシコキネティクス試験（経口投与） 266
2.6.7.B.14 生殖発生毒性試験：ラットの出生前及び出生後の発生毒性試験（経口投与） 270
2.6.7.B.15 生殖発生毒性試験：出生児（幼若動物）投与／評価試験 276
2.6.7.B.16 局所刺激性試験 277
2.6.7.B.17 その他の毒性試験：非ピボタル試験 278

Confidential

2.6.7.B.17A　その他の毒性試験：イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験（＋3ヵ月間休薬期間）...281
2.6.7.B.17B　その他の毒性試験：イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験.....287

Confidential

A 項：グラゾプレビル

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Single-Dose Toxicity	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Oral gavage	1 day	150, 350	No	MRL F	TT#[redacted]-6043	[資料4.2.3.1.1: TT#[redacted]-6043]
Repeat-Dose Toxicity	Mouse/ Jic:CB6F1-non TgrasH2@Jcl	Oral gavage	1 month	0, 20, 100, 200, 500	Yes[b]	MRL F	TT#[redacted]-6034	[資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034]
Repeat-Dose Toxicity	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Oral gavage	3 months	0, 20, 100, 200, 500	Yes[b]	MRL F	TT#[redacted]-6038	[資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038]
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	7 days	0, 20, 40, 200	No	MRL WP	TT#[redacted]-2525	[資料4.2.3.2.3: TT#[redacted]-2525]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	1 month	0, 25, 50, 1000	Yes	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-1152	[資料4.2.3.2.4: TT#[redacted]-1152]
Single and Repeat-Dose Toxicokinetic	Rat/ Crl:CD(SD)	Oral gavage	1 day or 14 days	50, 1000 (single dose) 50, 1000/300[c] (for 14 days)	No	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-1102	[資料4.2.3.2.5: TT#[redacted]-1102]
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	14 days or 1 month	0 b.i.d., 50, 200, 200 b.i.d.	Yes	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-1120	[資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120]
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	6 months	0 b.i.d., 50, 200, 200 b.i.d.	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6014	[資料4.2.3.2.7: TT#[redacted]-6014]
Repeat-Dose Toxicity	Dog/ Beagle	Oral capsule	Dose escalating; 9 days total	3, 30, 300	No	MRL WP	TT#[redacted]-1119	[資料4.2.3.2.8: TT#[redacted]-1119]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Repeat-Dose Toxicity	Dog/ Beagle	Oral capsule	1 month	0, 5, 20, 600	Yes	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-1151	[資料4.2.3.2.9: TT#[redacted]-1151]
Repeat-Dose Toxicity	Dog/ Beagle	Oral capsule	9 months with a 3-month interim necropsy[d]	0, 5, 15, 300/100[e]	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6015	[資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015]
Genotoxicity	*Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100, and TA1535 and *Escherichia coli* WP2 uvrA pKM101	In vitro	48 hrs (±S-9)	30 to 5000 µg/plate	Yes, except TT# [redacted]-8000	MRL WP	TT#[redacted]-8000; TT#[redacted]-8011	[資料 4.2.3.3.1.1: TT#[redacted]-8000]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Genotoxicity	Chinese hamster ovary cells	In vitro	3 hours (±S-9) 20 hours (-S-9)	20 to 50 µM 10 to 30 µM	Yes, except TT # [redacted]-8686	MRL WP	TT#[redacted]-8686; TT#[redacted]-8600	[資料 4.2.3.3.1.2: TT#[redacted]-8600]
Genotoxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage[f]	1 month: bone marrow sampled the day after the final dose	0, 25, 50, 1000	Yes	MRL WP	TT#[redacted]-8813	[資料 4.2.3.3.2.1: TT#[redacted]-8813]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Genotoxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage[g]	14 days or 1 month: bone marrow sampled the day after the final dose	2-week interim necropsy: 0, b.i.d., 50, 200 b.i.d. 1-month final necropsy: 0 b.i.d., 50 or 200, 200 b.i.d.	Yes	MRL WP	TT#[redacted]-8734	[資料 4.2.3.3.2.2: TT#[redacted]-8734]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	15 days prior to cohabitation, during cohabitation, and through GD 7 or until day removed from cohabitation for the females, and until the day prior to scheduled sacrifice for the males (approximately 6 weeks total)	0 b.i.d., 50, 200, 200 b.i.d.	Yes	MRL WP	TT#[redacted]-7260	[資料 4.2.3.5.1.1: TT#[redacted]-7260]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	GD 6 through 20	0 b.i.d., 50, 100, 200, 200 b.i.d.	No	MRL WP	TT#[redacted]-7055	[資料 4.2.3.5.2.1: TT#[redacted]-7055]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	GD 6 through 20 GD 6 through 15 for toxicokinetics	0 b.i.d., 50, 200, 200 b.i.d.	Yes[h]	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-7050	[資料 4.2.3.5.2.2: TT#[redacted]-7050]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage	1 day	25, 50, 100, 200, 425	No	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-7047	[資料 4.2.3.5.2.3: TT#[redacted]-7047]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage	1 day	50[i], 200[i]	No	MRL WP	TT#[redacted]-7048	[資料 4.2.3.5.2.4: TT#[redacted]-7048]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage	1 day	200 b.i.d.[i], 350	No	MRL WP	TT#[redacted]-7049	[資料 4.2.3.5.2.5: TT#[redacted]-7049]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage	1 day on SD 1 and 1 day on SD 8	200 b.i.d.[i]	No	MRL WP	TT#[redacted]-7046	[資料 4.2.3.5.2.6: TT#[redacted]-7046]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage	1 day	200[j], 625[j]; 200[k], 480[k]	No	MRL WP	TT#[redacted]-7044	[資料 4.2.3.5.2.7: TT#[redacted]-7044]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage	GD 7 through 20 GD 7 through 15 for toxico-kinetics	0 b.i.d., 50, 200; 200 b.i.d.	Yes[h]	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-7040	[資料 4.2.3.5.2.10: TT#[redacted]-7040]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage	7 days	25, 50, 100, 125 b.i.d.	No	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-7042	[資料 4.2.3.5.2.8: TT#[redacted]-7042]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage	5 days	100[j], 200[j],400[j] 100 b.i.d.[j],[l] 200 b.i.d.[j]; 400 b.i.d.[j]	No	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-7127	[資料4.2.3.5.2.9: TT#[redacted]-7127]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Intravenous	5 days	0, 50[k], 100[k], 200[k]	No	MRL WP	TT#[redacted]-7126	[資料 4.2.3.5.2.11: TT#[redacted]-7126]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Intravenous	GD 7 through 20 GD 7 through 15 for toxico-kinetics	0, 50[k], 100[k], 200[k]	No	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-7001	[資料 4.2.3.5.2.12: TT#[redacted]-7001]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Intravenous	GD 7 through 20 for cesarean-section; GD 7 through 15 for toxicokinetics	0, 25[k], 50[k], 100[k]	Yes	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-7300	[資料 4.2.3.5.2.13: TT#[redacted]-7300]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	GD 6 through LD 20	0 b.i.d., 25, 100, 200 b.i.d.	Yes	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-7010	[資料4.2.3.5.3.1: TT#[redacted]-7010]
Local Tolerance	Isolated Bovine Cornea	In vitro	4 hours	0, 20%	Yes[m]	[redacted]	TT#[redacted]-7866	[資料4.2.3.6.1: TT#[redacted]-7866]
Local Tolerance	Rabbit/ New Zealand White	Dermal	4 hours	0.5 g/ approx. 6-cm^2 site	Yes[m]	[redacted]	TT#[redacted]-7865	[資料4.2.3.6.2: TT#[redacted]-7865]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Other Toxicity Studies	Mouse/ CBA/J	Dermal	3 days	0, 5, 10, 25%	Yes[m]	[redacted]	TT#[redacted]-7864	[資料4.2.3.7.2.1: TT#[redacted]-7864]
Other Toxicity Studies	Mice/ Jic:CB6F1-non TgrasH2@Jcl	Oral gavage	Approx. 12 weeks[n]	0, 200, 500	No	MRL F	TT#[redacted]-6034	[資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034]
Other Toxicity Studies	Mouse/ C57BL/6 and BALB/c	Oral gavage	1 month	0, 200, 500	No	MRL F	TT#[redacted]-6039	[資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039]
Other Toxicity Studies	Mouse/ Jic:CB6F1-non TgrasH2@Jcl	Oral gavage[o]	Approx. 12 weeks[n]	0, 200, 500	No	MRL WP	TT#[redacted]-9693	[資料4.2.3.7.3.3: TT#[redacted]-9693]
Other Toxicity Studies	Mouse/ C57BL/6 and BALB/c	Oral gavage[p]	1 month	0, 200, 500	No	MRL WP	TT#[redacted]-9709	[資料4.2.3.7.3.4: TT#[redacted]-9709]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Other Toxicity Studies	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage[q]	6 months	0 b.i.d., 200 b.i.d.	No	MRL WP	TT#[redacted]-9745	[資料4.2.3.7.3.5: TT#[redacted]-9745]
Other Toxicity Studies	Dog/ Beagle	Oral capsule[r]	9 months with a 3-month interim necropsy[d]	0, 300/100[e]	No	MRL WP	TT#[redacted]-9746	[資料4.2.3.7.3.6: TT#[redacted]-9746]
Other Toxicity Studies	Rat/ Crl:LE (Long-Evans)	Oral gavage	3 days	0 b.i.d., 50, 200 b.i.d. on SDs 1 and 2 and 0, 50, 200 on SD 3	Yes[m]	[redacted]	TT#[redacted]-9002	[資料4.2.3.7.7.1: TT#[redacted]-9002]

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Other Toxicity Studies	Dog/ Beagle	Oral Grazoprevir: capsule; Elbasvir: gavage	1 month	0/5, 25/0, 25/5 (Elbasvir/ Grazoprevir)	Yes[s]	MRL F	TT#[redacted]-6051	[資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051]
Other Toxicity Studies	Monkey/ Rhesus	Oral gavage	7 days	10	No	MRL WP	TT#[redacted]-1059	[資料4.2.3.7.7.3: TT#[redacted]-1059]
Other Toxicity Studies	Human Whole Blood	In vitro	15 minutes	0, 0.00002 to 0.00107 mg/mL	No	MRL WP	TT#[redacted]-7867	[資料4.2.3.7.7.4: TT#[redacted]-7867]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

a　Unless otherwise specified.　For Repeat-Dose Toxicity, the NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect Level) is underlined.
b　With the exception of determination of the physical stability of the test article, evaluation of grazoprevir liver/gallbladder concentrations, and transmission electron microscopy which were non-GLP.
c　1000 mg/kg/day for 10 days, 300 mg/kg/day thereafter.
d　Interim necropsy limited to the low-dose group.
e　High dose lowered in Study Week 12.
f　Done in conjunction with One-Month Oral Toxicity Study in Rats (TT#[redacted]-1152) [資料4.2.3.2.4: TT#[redacted]-1152] [Sec. 2.6.6.A.3.4]
g　Done in conjunction with One-Month Oral Toxicity Study in Rats　with a 2-Week Interim Necropsy TT#[redacted]-1120 [資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120] [Sec. 2.6.6.A.3.6].
h　With the exception of GD 0 body weights and micro-computed tomography.
i　In 2 different vehicles.
j　Spray-dried formulation.
k　Nanoformulation.
l　Two dosing intervals tested.
m　With the exception of　test article characterization which was non-GLP (GMP).
n　Followed by an approx.12-week recovery period.
o　Done in conjunction with the Exploratory 12-Week Oral Biomarker Study in rasH2 Wild-Type Mice (Hybrid) with a 12-Week Recovery Period (TT#[redacted]-6034) [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] [Sec. 2.6.6.A.8.3.1.1]:　Serum, liver, and ileum samples were transferred to this study to explore the utility of metabolics technology to detect potential test article-related changes in bile acids in serum and liver, transcriptional endpoints in liver and ileum for bile acid transport and metabolism genes, miRNA species (miR 122 and miR 192), High Mobility Group Box-1, and serum amyloid A (SAA), cytokines in serum.
p　Done in conjunction with the Exploratory 1-Month Oral Toxicity Study in C57/BL6 and BALB/c mice (TT#[redacted]-6039) [資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039] [Sec. 2.6.6.A.8.3.1.2]: Serum,　liver, and ileum samples collected also were transferred to this study to detect potential test article-related changes in bile acids in serum, transcriptional endpoints in liver for bile acid transport, and metabolism genes, miRNA species (miR 122 and miR 192) and SAA, and grazoprevir serum and liver concentrations.
q　Done in conjunction with the Six-Month Oral Toxicity Study in Rats (TT#[redacted]-6014) [資料4.2.3.2.7: TT#[redacted]-6014] [Sec. 2.6.6.A.3.7]:　Remaining serum samples collected in Study Weeks 12 and 24 were transferred to this study to explore the utility of metabolics technology to detect potential test article-related changes in　rat serum bile acid (control and high-dose groups analyzed only).
r　Done in conjunction with the Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy (TT#[redacted]-6015) [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] [Sec. 2.6.6.A.3.10]. Remaining serum samples collected in Study Weeks 3/4, 11, 26, and 38 to this study to explore the utility of metabolomics technology to detect potential test article-related changes in the dog serum bile acids (control and high-dose groups analyzed only).
s　With the exception of evaluation of grazoprevir/elabsvir liver concentration which was non-GLP.
b.i.d. = bis in die; hr = hour; GD = Gestation Day; LD = Lactation Day; SD = Study Day; SW = Study Week.
[redacted] = [redacted], U.S.A.
[redacted] = [redacted], U.S.A.
MRL F = Merck Research Laboratories, Mirabel, Riom, France.
MRL WP = Merck Research Laboratories, West Point, Pennsylvania, U.S.A.

Confidential

2.6.7.A.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Grazoprevir

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location Vol. Section
Single-Dose Toxicokinetic	Mouse	Oral gavage	150, 350	No	TT#[redacted]-6043	[資料4.2.3.1.1: TT#[redacted]-6043]
One-Month Range-Finding	Mouse	Oral gavage	20, 100, 200, 500	Yes[a]	TT#[redacted]-6034	[資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034]
Three-Month Range-Finding	Mouse	Oral gavage	20, 100, 200, 500	Yes[a]	TT#[redacted]-6038	[資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038]
Seven-Day Tolerability	Rat	Oral gavage	20, 40, 200	No	TT#[redacted]-2525	[資料4.2.3.2.3: TT#[redacted]-2525]
One-Month Toxicity	Rat	Oral gavage	25, 50, 1000	Yes	TT#[redacted]-1152	[資料4.2.3.2.4: TT#[redacted]-1152]
Single Dose and Fourteen-Day Toxicokinetic	Rat	Oral gavage	50, 1000 (single dose) 50, 1000/300[b] (for 14 days)	No	TT#[redacted]-1102	[資料4.2.3.2.5: TT#[redacted]-1102]
One-Month Toxicity	Rat	Oral gavage	50, 200, 200 b.i.d.	Yes	TT#[redacted]-1120	[資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120]

Confidential

2.6.7.A.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location Vol. Section
Six-Month Toxicity	Rat	Oral gavage	50, 200, 200 b.i.d.	Yes	TT#[redacted]-6014	[資料4.2.3.2.7: TT#[redacted]-6014]
Nine-Day Rising-Dose Tolerability	Dog	Oral capsule	3, 30, 300	No	TT#[redacted]-1119	[資料4.2.3.2.8: TT#[redacted]-1119]
One-Month Toxicity	Dog	Oral capsule	5, 20, 600	Yes	TT#[redacted]-1151	[資料4.2.3.2.9: TT#[redacted]-1151]
Nine-Month Toxicity (with a 3-Month Interim Necropsy[c])	Dog	Oral capsule	5, 15, 300/100[d]	Yes	TT#[redacted]-6015	[資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015]
Developmental Toxicity	Rat	Oral gavage	50, 200, 200 b.i.d.	Yes[e]	TT#[redacted]-7050	[資料4.2.3.5.2.2: TT#[redacted]-7050]
Single-Dose Toxicokinetic	Rabbit	Oral gavage	25, 50, 100, 200, 425	No	TT#[redacted]-7047	[資料4.2.3.5.2.3: TT#[redacted]-7047]
Single-Dose Toxicokinetic	Rabbit	Oral gavage	50[f], 200[f]	No	TT#[redacted]-7048	[資料4.2.3.5.2.4: TT#[redacted]-7048]
Two-Day Toxicokinetic	Rabbit	Oral gavage	200 b.i.d.[f], 350	No	TT#[redacted]-7049	[資料4.2.3.5.2.5: TT#[redacted]-7049]

Confidential

2.6.7.A.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location Vol. Section
Nine-Day Toxicokinetic	Rabbit	Oral gavage	200 b.i.d.[f]	No	TT#[redacted]-7046	[資料4.2.3.5.2.6: TT#[redacted]-7046]
Single-Dose Toxicokinetic	Rabbit	Oral gavage	200g, 625g; 200[h], 480[h]	No	TT#[redacted]-7044	[資料4.2.3.5.2.7: TT#[redacted]-7044]
Preliminary Developmental Toxicity	Rabbit	Oral gavage	50, 200; 200 b.i.d.	Yes[e]	TT#[redacted]-7040	[資料4.2.3.5.2.10: TT#[redacted]-7040]
One-Week Toxicokinetic	Rabbit	Oral gavage	25, 50, 100, 125 b.i.d.	No	TT#[redacted]-7042	[資料4.2.3.5.2.8: TT#[redacted]-7042]
Five-Day Toxicokinetic	Rabbit	Oral gavage	100g, 200g,400g 100 b.i.d.[g,i] 200 b.i.d.[g] 400 b.i.d.[g]	No	TT#[redacted]-7127	[資料4.2.3.5.2.9: TT#[redacted]-7127]
Five-Day Toxicokinetic and Tolerability	Rabbit	Intravenous	50[h], 100[h], 200[h]	No	TT#[redacted]-7126	[資料4.2.3.5.2.11: TT#[redacted]-7126]

Confidential

2.6.7.A.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location Vol. Section
Preliminary Embryo-Fetal Developmental	Rabbit	Intravenous	50[h], 100[h], 200[h]	No	TT#[redacted]-7001	[資料4.2.3.5.2.12: TT#[redacted]-7001]
Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic	Rabbit	Intravenous	25[h], 50[h], 100[h]	Yes	TT#[redacted]-7300	[資料4.2.3.5.2.13: TT#[redacted]-7300]
Pre- and Postnatal Developmental Toxicity	Rat	Oral gavage	25, 100, 200 b.i.d.	Yes	TT#[redacted]-7010	[資料4.2.3.5.3.1: TT#[redacted]-7010]
One-Month Toxicity	Dog	Oral Grazoprevir: capsule; Elbasvir: gavage	0/5, 25/0, 25/5 (Elbasvir/ Grazoprevir)	Yes[j]	TT#[redacted]-6051	[資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051]
Eight-Day Tolerability	Monkey	Oral gavage	10	No	TT#[redacted]-1059	[資料4.2.3.7.7.3: TT#[redacted]-1059]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表（続き）

Test Article:　Grazoprevir

a　With the exception of determination of the physical stability of the test article, evaluation of grazoprevir liver/gallbladder concentrations, and transmission electron microscopy which were non-GLP.
b　1000 mg/kg/day for 10 days, 300 mg/kg/day thereafter.
c　Interim necropsy limited to the low-dose group.
d　High dose lowered in Study Week 12.
e　With the exception of GD 0 body weights and micro-computed tomography.
f　In 2 different vehicles.
g　Spray-dried formulation.
h　Nanoformulation.
i　Two dosing interval tested.
j　With the exception of the evaluation of grazoprevir/elabsvir liver concentration which was non-GLP.
GD = Gestation Day; hr = Hour; SW = Study Week.

Confidential

2.6.7.A.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表

Test Article:　Grazoprevir

Steady State AUC0-24hr (µM•hr) - Sexes Combined

Daily Dose (mg/kg)	**Mice**		**Rat**				**Dog**					**Rabbit[a]**	**Human[b]**
	rasH2 Wild-type Mice	**CD1 Mice**											
	SW4	**SW13**	**SW2**	**SW4/5**	**SW9**	**SW13**	**SW3**	**SW4/5**	**SW12**	**SW16**	**SW26**	**GD15**	
1.7													4.438
5								30.3[i] 65.4[j] 70.5[h]	69.3[h]				
15								335[h]	367[h]				
20	5.00[c]	7.96[d]						497[j]					
25				8.76[f]								6.14[k]	
50			73.8[e]	23.0[f] 32.1[e] 85.4[g]	110[g]	103[g]						24.4[k]	
100	164[c]	451[d]								2490[h]	2300[h]	76.1k	
200	333[c]	820[d]		117[e] 368[g]	371[g]	370[g]							
300							2440[h]		2620[h]				
400 (administered as 200 mg/kg b.i.d.)			251[e]	212[e] 311[g]	367[g]	445[g]							
500	2810[c]	1470[d]											
600								2930[j]					
1000				24.3[f]									

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

Test Article:　Grazoprevir

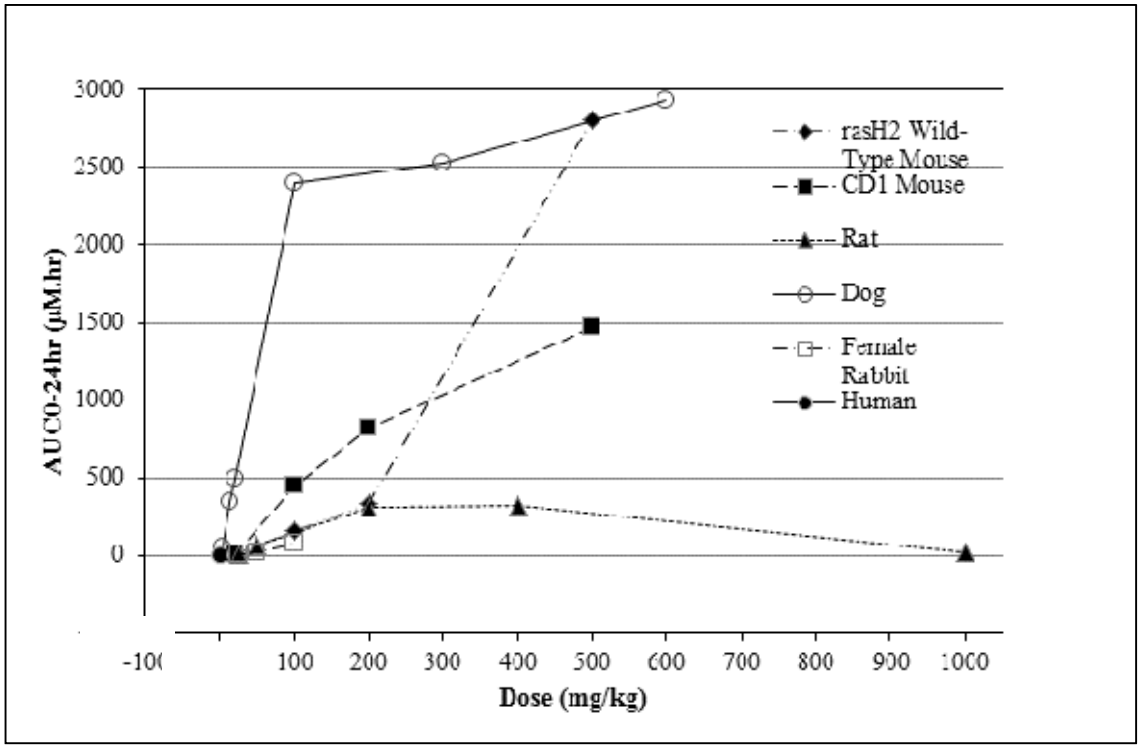
a　Method of administration: Intravenous.
b　Clinical recommended dose is 100 mg.　The clinical daily dose is 1.7 mg/kg based on a 60-kg human weight with a corresponding $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ of 4.438 μM•hr.
c　One-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in rasH2 Wild-Type Mice (Hybrid) (TT#[redacted]-6034) [資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034] [Sec. 2.6.6.A.3.1].
d　Three-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in CD1 Mice (TT#[redacted]-6038) [資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038] [Sec. 2.6.6.A.3.2].
e　One-Month Oral Toxicity Study in Rats with a Functional Observational Battery (FOB) With a 2-Week Interim Necropsy (TT#[redacted]-1120) [資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120] [Sec. 2.6.6.A.3.6].
f　One-Month Oral Toxicity Study in Rats with a Functional Observational Battery (FOB) (TT#[redacted]-1152) [資料4.2.3.2.4: TT#[redacted]-1152] [Sec. 2.6.6.A.3.4].
g　Six-Month Oral Toxicity Study in Rats (TT#[redacted]-6014) [資料4.2.3.2.7: TT#[redacted]-6014] [Sec. 2.6.6.A.3.7].
h　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy (TT#[redacted]-6015) [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] [Sec. 2.6.6.A.3.10].
i　One-Month Oral Combination Toxicity Study in Dogs (TT#[redacted]-6051) [資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051] [Sec. 2.6.6.A.8.7.2.1].
j　One-Month Oral Toxicity Study in Dogs (TT#[redacted]-1151) [資料4.2.3.2.9: TT#[redacted]-1151] [Sec. 2.6.6.A.3.9].
k　Intravenous Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rabbits (TT#[redacted]-7300) [資料4.2.3.5.2.13: TT#[redacted]-7300] [Sec. 2.6.6.A.6.2.7].
b.i.d. = bis in die; GD = Gestation Day; SW = Study Week.

Confidential

2.6.7.A.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Steady State $AUC_{0\text{-}24hr}$ (µM•hr)



Confidential

2.6.7.A.4　毒性試験：被験物質（バッチごと）一覧

Test Article:　Grazoprevir

Batch No.	**Purity (%)**[2]	**Specified Impurities (HPLC, area %)**[3]						**Study Number**	**Type of Study**
		A[4]	**B**[5]	**C**[6]	**D**[7]	**E**[8]	**F**[9]		
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-2525	Exploratory 7-Day Oral Tolerability Study in Female Rats
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-1119	Exploratory 9-Day Oral Rising-Dose Tolerability Study in Dogs
[redacted]	[redacted]10	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-1151	One-Month Oral Toxicity Study in Dogs
								TT#[redacted]-1152	One-Month Oral Toxicity Study in Rats with a Functional Observational Battery (FOB)
								TT#[redacted]-8813	Assay for Micronucleus Induction In Rat Bone Marrow From a 1-Month Oral Toxicity Study
								TT#[redacted]-1059	Exploratory 8-Day Oral Tolerability Study in Rhesus Monkeys

Confidential

2.6.7.A.4　毒性試験：被験物質（バッチごと）一覧（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Batch No.	Purity (%)[2]	Specified Impurities (HPLC, area %)[3] A[4]	B[5]	C[6]	D[7]	E[8]	F[9]	Study Number	Type of Study
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted] (Cont.)								TT#[redacted]-1102	Exploratory Single and Multiple Dose Oral Toxicokinetic Study in Rats
								TT#[redacted]-1120	One-Month Oral Toxicity Study in Rats with a Functional Observational Battery (FOB) with a 2-Week Interim Necropsy
								TT#[redacted]-8000; TT#[redacted]-8011	Microbial Mutagenesis Assay
								TT#[redacted]-8600; TT#[redacted]-8686	Assay for Chromosomal Aberrations In Vitro, in Chinese Hamster Ovary Cells
								TT#[redacted]-8734	Assay for Micronucleus Induction in Rat Bone Marrow from a 1-Month Oral Toxicity Study with a 2-Week Interim Necropsy
								TT#[redacted]-7047	Exploratory Oral Single Dose Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits

Confidential

2.6.7.A.4　毒性試験：被験物質（バッチごと）一覧（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Batch No.	**Purity (%)[2]**	**Specified Impurities (HPLC, area %)[3]**						**Study Number**	**Type of Study**
		A[4]	**B[5]**	**C[6]**	**D[7]**	**E[8]**	**F[9]**		
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-6014	Six-Month Oral Toxicity Study in Rats
								TT#[redacted]-6015	Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy
								TT#[redacted]-7055	Exploratory Oral Range-Finding Study in Pregnant Rats
								TT#[redacted]-7048	Exploratory Oral Single Dose Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits
								TT#[redacted]-7867	In Vitro Hemolysis Assay of MK-5172 Formulation

Confidential

2.6.7.A.4　毒性試験：被験物質（バッチごと）一覧（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Batch No.	**Purity (%)**[2]	**Specified Impurities (HPLC, area %)**[3]						**Study Number**	**Type of Study**
		A[4]	**B**[5]	**C**[6]	**D**[7]	**E**[8]	**F**[9]		
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-6014	Six-Month Oral Toxicity Study in Rats
								TT#[redacted]-6015	Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy
								TT#[redacted]-7040	Preliminary Oral Developmental Toxicity Study in Rabbits
								TT#[redacted]-7042	Exploratory One-Week Oral Toxicokinetic study in Nonpregnant Rabbits
								TT#[redacted]-7046	Exploratory Oral 9-Day Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits
								TT#[redacted]-7049	Exploratory Oral Two-Day Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits

Confidential

2.6.7.A.4　毒性試験：被験物質（バッチごと）一覧（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Batch No.	**Purity (%)[2]**	**Specified Impurities (HPLC, area %)[3]**						**Study Number**	**Type of Study**
		A[4]	**B[5]**	**C[6]**	**D[7]**	**E[8]**	**F[9]**		
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted] (Cont.)								TT#[redacted]-7050	Oral Developmental Toxicity Study in Rats with Prenatal Evaluation
								TT#[redacted]-7260	Oral Fertility Study in Female and Male Rats
								TT#[redacted]-6051	One-Month Oral Combination Toxicity study in Dogs
								TT#[redacted]-9002	Three Day Oral (Gavage) Phototoxicity and Bioanalysis Evaluation of MK-5172 in Male Pigmented Rats
								TT#[redacted]-7010	Oral Pre- and Postnatal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats

Confidential

2.6.7.A.4　毒性試験：被験物質（バッチごと）一覧（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Batch No.	Purity (%)[2]	Specified Impurities (HPLC, area %)[3] A[4]	B[5]	C[6]	D[7]	E[8]	F[9]	Study Number	Type of Study
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted]	[redacted]10	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-7044	Exploratory Oral Single Dose Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-6043	Exploratory Single-Dose Oral Toxicokinetic Study in Male CD1 Mice
								TT#[redacted]-6034	One-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in rasH2 Wild-Type Mice (Hybrid)
								TT#[redacted]-7127	Exploratory Five-Day Oral Toxicokinetic Study in Nonpregnant Rabbits
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-7866	Bovine Corneal Opacity and Permeability Test (BCOP)
								TT#[redacted]-7865	Acute Dermal Irritation/Corrosion in Rabbits
								TT#[redacted]-7864	Local Lymph Node Assay in Mice (LLNA)

Confidential

2.6.7.A.4　毒性試験：被験物質（バッチごと）一覧（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Batch No.	Purity (%)[2]	Specified Impurities (HPLC, area %)[3] A[4]	B[5]	C[6]	D[7]	E[8]	F[9]	Study Number	Type of Study
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-6043	Exploratory Single-Dose Oral Toxicokinetic Study in Male CD1 Mice
								TT#[redacted]-6034	One-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in rasH2 Wild-Type Mice (Hybrid)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-6038	Three-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in CD1 Mice
								TT#[redacted]-7126	Exploratory 5-Day Intravenous Toxicokinetic and Tolerability Study in Nonpregnant Rabbits
								TT#[redacted]-6034; TT#[redacted]-9693	Exploratory 12-Week Oral Biomarker Study in rasH2 Wild-Type Mice (Hybrid) with a 12-Week Recovery Period
								TT#[redacted]-6039; TT#[redacted]-9709	Exploratory One-Month Oral Toxicity Study in C57BL/6 and BALB/c Mice

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.4　毒性試験：被験物質（バッチごと）一覧（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Batch No.	Purity (%)[2]	Specified Impurities (HPLC, area %)[3] A[4]	B[5]	C[6]	D[7]	E[8]	F[9]	Study Number	Type of Study
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-7001	Preliminary Intravenous Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rabbits
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-7300	Intravenous Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rabbits

1 See [Sec. 3.2.S.4.1] for complete specification.
2 Purity:　HPLC weight percent (calculated as monohydrate, solvent free basis).
3 Specified impurities:　HPLC area percent.
4 [redacted]
5 [redacted]
6 [redacted]
7 Individual, Unspecified impurity.　For lots with multiple unspecified impurities, this value represents the worst case (*i.e.*, the unspecified impurity present at the highest level).
8 [redacted]
9 Total Impurities.
10 Assay by $HClO_4$ titration performed at time of release.
N/A = Not applicable; ND = None detected (<[redacted]%); NQ = Non-quantifiable ([redacted]% ≤NQ ≤[redacted]%) ; NT= Not tested.
*　Early chemistry batch.　Purity [redacted]%.　Impurity profile not characterized.

Confidential

2.6.7.A.5　単回投与毒性試験

No formal single dose toxicity studies have been conducted.　However, acute toxicity was assessed in repeat-dose toxicity studies, where oral doses of grazoprevir up to 500 mg/kg/day in mice, 1000 mg/kg in rats (with highest $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ at 200 mg/kg b.i.d., *i.e.* total daily dose of 400 mg/kg) and up to 600 mg/kg in dogs were administered.　There was no evidence of acute toxicity in these species [Sec. 2.6.6.A.3].

Test Article:　Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)**	**Approximate Lethal Dose (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Oral gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water/SDF)	150, 350	11M/group	350	>350	**350 mg/kg**:　No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM•hr):　1420; C_{max} (μM):　95.1; T_{max} (hr): 4 **150 mg/kg**:　No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM•hr):　953; C_{max} (μM):　94.4; T_{max} (hr):　4	TT#[redacted]-6043 [資料4.2.3.1.1: TT#[redacted]-6043]

M = Male.
SDF = Spray-dried formulation containing 50% (w/w) of grazoprevir (free acid) and 50% (w/w) of hydroxypropylmethylcellulose-phtalate.

Confidential

2.6.7.A.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL[a] (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage (100% polyethylene glycol 400/Solution)	7 days	0, 20, 40, 200	5F/group	≥200	**200 mg/kg:** Very slight test article-related increases in triglycerides. *Grazoprevir* $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr): 634.8; Cmax (µM): 127.7; $T_{max\ (hr)}$: 2.6 hr Liver (µM): 36.3. **40 mg/kg**: Very slight test article-related increases in triglycerides. *Grazoprevir* AUC0-24 hr (µM•hr): 117.6; C_{max} (µM): 14.8; T_{max} (hr): 3.2; Liver (µM): 64.5.	TT#[redacted]-2525 [資料4.2.3.2.3: TT#[redacted]-2525]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL[a] (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/ Crl:WI(Han)	Oral (100% PEG 400/ Solution)	7 days	0, 20, 40, 200	5F/group	≥200	**20 mgkg**:　No test article-related findings. *Grazoprevir* $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr):　14.6; C_{max} (μM):　4.1; T_{max} (hr):　2.4; Liver (μM):　27.9.	TT#[redacted]-2525 [資料4.2.3.2.3: TT#[redacted]-2525] (Continued)

a　No-Observed-Adverse-Effect Level.
F = Female; PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

2.6.7.A.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL[a] (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/ Crl:CD(SD)	Oral gavage (100% PEG 400/ Solution or suspension)	1 day or 14 days	50, 1000 mg/kg (single dose) 50, 1000/300[b] for 14 days	3 or 6F/group	N/A	**1000/300 mg/kg/day:** No unscheduled deaths. *Grazoprevir* After 1 dose: $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM·hr): 36.5[c,f],21.0[d,f], 34.3[e,f], 14.3[e,g] C_{max} (μM): 7.08[c,f], 2.25[d,f], 8.08[e,f], 2.6 [e,g]; T_{max} (hr): 1.7[c,f], 4.7[d,f], 2.2[e,f], 2.3[e,g]; Liver (μM): 58.4[c,f] After 14 doses: $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM•hr): 140[c,f] C_{max} (μM): 24.4[c,f] T_{max} (hr): 1.0[c,f] Liver (μM): 33.7[c,f]	TT#[redacted]-1102 [資料4.2.3.2.5: TT#[redacted]-1102]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/ Crl:CD(SD)	Oral gavage (100% PEG 400/ Solution or suspension)	1 day or 14 days	50, 1000 mg/kg (single dose) 50, 1000/300[b] for 14 days	3 or 6F/group	N/A	**50 mg/kg/day:** No unscheduled deaths. *Grazoprevir* After 1 dose: $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr): 101[c,f], 181[d,f], 69.8[e,f] C_{max} (µM): 13.8[c,f], 27.8[d,f], 19.3[e,f] T_{max} (hr): 3.0[c,f], 2.0[d,f], 1.7[e,f] Liver (µM): 32.6[c,f] After 14 doses: $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr): 70.0[c,f] C_{max} (µM): 11.4[c,f] T_{max} (hr): 3.3[c,f] Liver (µM): 14.4[c,f]	TT#[redacted]-1102 [資料4.2.3.2.5: TT#[redacted]-1102] (Continued)

a No-Observed-Adverse-Effect Level.
b 1000 mg/kg/day for 10 days, 300 mg/kg/day thereafter.
c Grazoprevir formulations admistered to the rats prepared as stand alone formulations and protected from light.
d Grazoprevir formulations admistered to the rats prepared with dilutions.
e Grazoprevir formulations admistered to the rats prepared as stand alone formulations.
f Bioanalysis performed in the laboratory which performed the bioanalyis in One-Month Oral Toxicity Study in Rats (TT#[redacted]-1152) [資料4.2.3.2.4: TT#[redacted]-1152] [Sec. 2.6.6.A.3.4].
g Bioanalysis performed in the laboratory which performed the bioanalyis in Exploratory 7-Day Oral tolerability Study in Female Rats (TT#[redacted]-2525) [資料4.2.3.2.3: TT#[redacted]-2525] [Sec. 2.6.6.A.3.3].
F = Female; PEG = Polyethylene Glycol; N/A = Not Applicable.

Confidential

2.6.7.A.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Dog/ Beagle	Oral capsule (100% PEG 400/ Solution or suspension)	dose escalating; 9 days total	3, 30, 300	2M	N/A	**300 mg/kg/day:** Test article-related foamy emesis and very slight increases in total bilirubin and decreases in albumin and calcium. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 1689; C_{max} (μM): 111; T_{max} (hr): 6.0. **30 mg/kg/day**: No test article-related findings. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 659; C_{max} (μM): 52; T_{max} (hr): 2.5. **3 mg/kg/day**: No test article-related findings. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 8.4; C_{max} (μM): 2.7; T_{max} (hr): 2.0.	TT#[redacted]-1119 [資料4.2.3.2.8: TT#[redacted]-1119]

a　No-Observed-Adverse-Effect Level; M = Male; N/A = Not Applicable; PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

2.6.7.A.7A　反復投与毒性試験：Ras H2 野生型マウス（交雑系）の1ヵ月間経口投与用量設定試験

Test Article: Grazoprevir

Species/Strain: Mice/Jic:CB6F1-nonTgrasH2@Jcl **Initial Age:** 6 to 7 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 10 mL/kg	**Duration of Dosing:** 1 month **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral (gavage) **Vehicle:** 0.5% (w/v) methylcellulose/0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water **Control Formulation:** HPMCP at 50 mg/mL (same amount as in high-dose animals) in the vehicle (pH = 7) **Grazoprevir Formulation**: SDF containing 50% (w/w) of grazoprevir (free acid) and 50% (w/w) of HPMCP in the vehicle (pH = 7)	**Study Number:** TT#[redacted]-6034 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034] **GLP Compliance:** Yes[a]
Special Features: Evaluation of grazoprevir liver and gallbladder concentrations and transmission electron microscopy in the liver **No-Observed-Adverse-Effect Level:** 100 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Toxicokinetics– Study Week 4										
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	5.34	4.66	190	138	335	332	2140	3470
C_{max} (µM)	N/A	N/A	2.16	1.97	36.2	45.4	61.5	83.0	234	290
T_{max} (hr)	N/A	N/A	0.50	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	0.50	2.0

Confidential

2.6.7.A.7A　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Liver-Gallbladder grazoprevir Concentrations (µM)[c] **– Study Week 4**										
4 Hours Postdose	N/A	N/A	118	128	297	250	290	391	636	724
8 Hours Postdose	N/A	N/A	62.3	87.9	222	365	341	381	451	436
24 Hours Postdose	N/A	N/A	1.41	5.21	14.81	87.7	166	172	464	516

Confidential

2.6.7.A.7A　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings										
Mortality (No. of Animals)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[d]	22.0 g	28.8 g	-0.5	-1.1	+3.2	-3.8	+1.8	-4.5	-1.4	-16.8
Body Weight Change (g)[e]										
Study Week 1 to Study Week 2	+0.4	+1	+0.4	+0.6	+0.7	+0.8	+0.6	+0.4	[-0.8]	[-0.3]
Pretest to Study Week 4	-	+3.4	-	+3.1	-	+2.5	-	+1.9	-	[-3.6]
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology[e] **– Study Week 5**										
Red Blood Cell Count ($10^{[6]}$/L)	10.29	10.13	10.36	10.14	9.99	10.42	10.13	10.45	[10.36]	[10.85]
Mean Corpuscular Volume (fL)	48.5	48.1	48.3	48.0	48.3	48.1	48.2	47.4	[47.5]	[46.5]
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	15.3	14.9	15.3	15.0	15.1	14.7	14.9	14.5	[14.4]	[14.0]

Confidential

2.6.7.A.7A　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings (Continued)										
Hematology[e] **– Study Week 5 (Continued)**										
Mean Corpuscular Hemoglobin concentration (g/dL)	31.5	31.0	31.8	31.3	31.3	30.5	31.0	30.6	[30.4]	[30.0]
Platelet Count ($10^{[3]}$/μL)	1092	1162	1219	1044	1136	1259	1194	[1388]	[1281]	[1384]
White Blood Cell Count ($10^{[3]}$/μL)	2.71	2.26	2.43	2.36	[1.92]	2.46	[1.61]	2.37	[1.71]	[3.68]
Neutrophils ($10^{[3]}$/μL)	-	0.47	-	0.33	-	0.26	-	0.28	-	[0.72]
Lymphocytes ($10^{[3]}$/μL)	2.39	1.75	2.09	1.97	[1.62]	2.14	[1.41]	2.03	[1.37]	[2.82]
Eosinophils ($10^{[3]}$/μL)	-	0.02	-	0.03	-	0.03	-	0.03	-	[0.09]

Confidential

2.6.7.A.7A　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings (Continued)										
Serum Biochemistry[e] **– Study Week 5**										
Glucose (mg/dL)	205	207	192	198	211	213	200	[228]	[245]	[241]
Blood Urea Nitrogen (mg/dL)	-	26	-	27	-	26	-	24	-	[27]
Total Protein (g/dL)	4.7	4.8	4.6	4.8	4.7	4.8	[4.4]	4.6	[4.3]	[4.3]
Albumin (g/dL)	3.3	3.3	3.2	3.4	3.3	3.2	[3.1]	3.2	[3.0]	[3.0]
Globulin (g/dL)	1.4	1.5	1.4	1.5	1.4	1.5	[1.3]	1.5	[1.3]	[1.4]
Aspartate Aminotransferase (IU/L)	60	44	65	42	55	36	65	34	[141]	[61]
Alanine Aminotransferase (IU/L)	30	23	36	21	33	21	[55]	24	[159]	[70]
Alkaline Phosphatase (IU/L)	105	87	115	90	112	85	[114]	98	[121]	[119]

Confidential

2.6.7.A.7A　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings (Continued)										
Serum Biochemistry[e] **– Study Week 5 (Continued)**										
Phosphorus (mg/dL)	6.2	6.3	7.5	5.7	6.7	6.7	[7.8]	7.0	[7.9]	[9.1]
Cholesterol (mg/dL)	65	92	63	87	[78]	[109]	[72]	[115]	[90]	[107]
Total Bilirubin (mg/dL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	[0.3]	[0.3]	[0.8]	[2.0]	[4.7]
Organ Weights[f]										
Liver (% Brain Weight)	161.2	220.2	+7.6	-2.1	[+21]*	+3.1	[+26]*	[+12]*	[+77]*	[+34]*
Gross Pathology (Incidence)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liver										
Increased size	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[3/10]	[3/10]
Prominent lobular pattern	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[2/10]

Confidential

2.6.7.A.7A　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings (Continued)										
Histomorphology (Incidence)										
Kidney										
Tubule, epithelial degeneration	0/10	0/10	NE	NE	NE	NE	0/10	0/10	[3/10]	[8/10]
Liver										
Hepatocyte, increased size	0/10	0/10	NE	NE	NE	0/10	0/10	[7/10]	[9/10]	[9/10]
Periportal region, cytoplasmic rarefaction	0/10	-	NE	NE	NE	-	0/10	-	[3/10]	-
Small Intestine										
Villous atrophy	0/10	0/10	NE	NE	NE	NE	0/10	0/10	[7/10]	[10/10]

Confidential

2.6.7.A.7A　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings (Continued)										
Additional Examinations										
Transmission Electron Microscopy - Liver										
Large amounts of granular cytoplasmic structures, compatible with glycogen, in periportal and centrilobular hepatocytes	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[1/2][g]	0/2[g]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.7A　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.2.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

a With the following exceptions that were considered exploratory (non-GLP): determination of the physical stability of the test article; determination of grazoprevir concentrations in liver/gallbladder homogenate; and transmission electron microscopy.
b Including 2 spare mice/sex/group. Animals from the toxicokinetic component were examined for mortality only during the study and were discarded without postmortem examination after the liver sampling on Study Day 27 or 28 (after 27 days of dosing).
c Assuming liver-gallbladder density of 1.
d At end of dosing period (Study Week 4). For controls, group means are shown. For treated-groups, percent differences from controls are shown.
e Control and test article group values are mean absolute values.
f Control values are the mean organ weight as a percent of brain weight; treatment group values are the mean percent change from concurrent controls of organ weight relative to brain weight. Statistics performed by trend assessment by sexes separate.
g Livers from 2 males and 2 females from the 500-mg/kg/day dose group were examined.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
#/# = Number affected/number examined.
* = $p \leq 0.05$.
F = Female; HPMCP = Hydroxypropylmethylcellulose phthalate; M = Male; N/A = Not applicable; NE = Not examined; SDF = Spray-Dried Formulation.

Confidential

2.6.7.A.7B　反復投与毒性試験：CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験

Test Article: Grazoprevir

Species/Strain: Mice/CRL:CD1(ICR) **Initial Age:** ~6 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 10 mL/kg	**Duration of Dosing:** 3 months **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral (gavage) **Vehicle:** 0.5% (w/v) methylcellulose/0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water **Control Formulation:** SDF containing 50 mg/mL of HPMCP (same amount as in high-dose animals) in the vehicle **Grazoprevir Formulation**: SDF containing 50% (w/w) of grazoprevir free acid and 50% (w/w) of HPMCP in the vehicle	**Study Number:** TT#[redacted]-6038 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038] **GLP Compliance:** Yes[a]
Special Features: Evaluation of grazoprevir liver and gallbladder concentrations and transmission electron microscopy in the liver **No-Observed-Adverse-Effect Level:** 200 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Toxicokinetics– Study Week 13										
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	9.02	6.91	448	455	957	683	1550	1390
C_{max} (µM)	N/A	N/A	1.56	1.47	51.6	38.5	67.4	50.9	150	108
T_{max} (hr)	N/A	N/A	0.50	0.50	0.50	1.0	8.0	1.0	2.0	2.0

Confidential

2.6.7.A.7B　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6038 [資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Liver-Gallbladder grazoprevir Concentrations (µM)[c] **– Study Week 13**										
4 Hours Postdose	N/A	N/A	148[d]	187[d]	293[d]	338[d]	465	442	519	435
8 Hours Postdose	N/A	N/A	94.7	92.5	358	420	466	417	552	412
24 Hours Postdose	N/A	N/A	1.35	3.41	18.5	75.2	56.8	77.6	201	173

Confidential

2.6.7.A.7B　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6038 [資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings										
Mortality (No. of Animals)[e]	1[f]	0	1[f]	0	0	1	1	0	1	2[f][1]
Body Weight (%)[g]	32.0 g	43.2 g	+6.6	+7.2	-3.1	-2.8	-3.4	-3.9	-2.2	-8.1
Body Weight Change[h] **(g)**	-	+ 9.2	-	+11.0	-	+7.4	-	+7.6	-	[+5.3]
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.7B　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6038 [資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings (Continued)										
Hematology[h] **– Study Week 14**										
Red Blood Cell Count ($10^{[6]}/\mu L$)	9.39	9.28	9.37	9.05	9.21	9.04	9.18	9.13	[9.04]	[8.55*]
Hemoglobin (g/dL)	14.4	14.3	14.7	14.0	14.0	13.2*	13.7	13.6	[12.4*]	[11.4*]
Mean Corpuscular Volume (fL)	50.9	51.5	51.7	52.4	50.5	50.1	50.6	50.9	[48.5*]	[47.5*]
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	15.4	15.4	15.7	15.5	15.2	14.6*	15.0	14.9	[13.7*]	[13.4*]
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (g/dL)	30.3	29.9	30.3	29.6	30.1	29.1*	29.6	29.4	[28.3*]	[28.1*]
White Blood Cell Count ($10^{[3]}/\mu L$)	2.79	-	3.06	-	3.57	-	3.57	-	[4.24]	-
Neutrophils ($10^{[3]}/\mu L$)	0.47	-	0.53	-	0.72	-	0.57	-	[0.92]	-
Lymphocytes ($10^{[3]}/\mu L$)	2.17	-	2.41	-	2.68	-	2.79	-	[3.14]	-

Confidential

2.6.7.A.7B　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6038 [資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings (Continued)										
Serum Biochemistry[h] **(Continued)**										
Glucose (mg/dL)[i]										
Study Week 14	155	183	137	183	152	186	174	[203]	[188]	[216]
Alanine Aminotransferase (IU/L)										
Study Week 8	-	26	-	26	-	34	-	26	-	[42*]
Study Week 12	21	32	24	31	28	37	[38*]	30	[40*]	36
Study Week 14	-	23	-	22	-	29	-	26	-	[42*]
Alkaline Phosphatase (IU/L)										
Study Week 8	-	60	-	62	-	78	-	[83*]	-	[93*]
Study Week 12	67	50	87	56	81	69	86	[77*]	[98*]	[85*]
Study Week 14	65	52	85	50	81	74	[94*]	[80*]	[94]	[86*]
Cholesterol (mg/dL)										
Study Week 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Study Week 12	99	-	100	-	112	-	117	-	[144*]	-
Study Week 14	101	146	91	130	106	167	111	127	[141*]	129

Confidential

2.6.7.A.7B　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6038 [資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings (Continued)										
Serum Biochemistry[h] **(Continued)**										
Total Bilirubin (mg/dL)										
Study Week 8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	[0.2]	[0.2*]	[0.3*]	[2.0*]	[3.2*]
Study Week 12	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	[0.2][j]	[0.3*]	[0.2*]	[2.2*]	[2.2*]
Study Week 14	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	[0.2*]	[0.5*]	[1.1*]
Organ Weights[k]										
Liver (% Brain Weight)	242.3	290.1	-3.2	+17	+9.8	+8.0	[19*]	[23*]	[73*]	[+56*]
Gross Pathology (Incidence)										
Liver										
Increased size	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[4/10]	[2/10]
Prominent lobular pattern	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[3/10]

Confidential

2.6.7.A.7B　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6038 [資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		20		100		200		500	
Number of Animals										
Range-Finding Component	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetic Component[b]	F:5	M:5	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11	F:11	M:11
Noteworthy Findings (Continued)										
Histomorphology (Incidence)										
Kidney										
Tubule, epithelial degeneration	0/10	0/10	NE	NE	NE	NE[m]	0/10	0/10	3/10	6/10
Liver										
Hepatocyte, increased size	0/10	0/10	NE	NE	0/10	0/10	2/10	10/10	8/10	9/10
Periportal region, cytoplasmic rarefaction	0/10	-	NE	NE	0/10	-	1/10	-	7/10	-
Gallbladder										
Inflammation	0/10	0/10	NE	NE	NE	NE[m]	0/10	0/10	1/10	1/10
Transmission Electron Microscopy - Liver[l]										
Cytoplasmic accumulation of large amounts of glycogen in periportal and centrilobular hepatocytes (more pronounced in females)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[2/2]	[2/2]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.7B　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6038 [資料4.2.3.2.2: TT#[redacted]-6038] (Continued)

a　With the following exceptions that were considered exploratory (non-GLP):　determination of the physical stability of the test article; determination of grazoprevir concentration in liver/gallbladder homogenate; and transmission electron microscopy.
b　Including 2 spare mice/sex/group. Mice from the toxicokinetic component were examined for mortality only during the study and were discarded without postmortem examination after the liver sampling on Study Day 88 or 89 (after 88 days of dosing).
c　Assuming liver or liver-gallbladder density of 1.
d　Only liver tissue was collected.
e　Test article-related mortality is indicated in [ ].　The remaining unscheduled deaths were due to intubation accident.
f　Unscheduled death animal from the toxicokinetic component.　The unscheduled death of the 100-mg/kg/day dosed female was due to intubation accident, the cause of the unscheduled death of the 500-mg/kg/day dosed male remained undetermined.
g　Difference in body weight between pretest period and weight obtained at the end of the dosing period (Study Week 13).　For controls, group means are shown. For dose groups, percent differences from controls are shown.
h　Control and treatment group values are mean absolute values.
i　Not examined in Study Weeks 8 and 12.
j　Increased total bilirubin in a single male (0.2 mg/dL).
k　Control values are the mean organ weight as a percent of brain weight; treatment group values are the mean percent change from concurrent controls of organ weight relative to brain weight.　Statistics performed by trend assessment by sexes separate; * = $p \leq 0.05$.
l　Livers from 2 male and 2 female from the 500-mg/kg/day dose group were examined.
m　Group not examined except 1 found dead rat (cause of death intubation accident).
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
#/# = number affected/number examined.
F = Female; HPMCP = Hydroxypropylmethylcellulose phthalate; M = Male; N/A = Not applicable, samples from control animals were not analyzed; NE = Not examined;
SDF = Spray-Dried Formulation.

Confidential

2.6.7.A.7C　反復投与毒性試験：ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（機能観察総合評価を含む）

Test Article: Grazoprevir

Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han) **Initial Age:** 5 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 2 mL/kg	**Duration of Dosing:** 1 month **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral (gavage) **Vehicle/Formulation:** 100% polyethylene glycol 400/Solution or suspension depending on dose	**Study Number:** TT#[redacted]-1152 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.4: TT#[redacted]-1152] **GLP Compliance:** Yes
Special Features: Functional observational battery assay (Study Day 1) **No-Observed-Adverse-Effect Level:** ≥1000 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		25		50		1000	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetics[a] – Study Week 5								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	7.44 ± 2.62	10.1 ± 2.84	29.6 ± 8.84	16.5 ± 6.40	26.4 ± 5.68	22.2 ± 6.86
C_{max} (µM)	N/A	N/A	2.93 ± 1.68	5.24 ± 1.87	10.6 ± 3.79	8.13 ± 4.08	8.11 ± 2.49	7.03 ± 3.66
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.0 ± NC	2.0 ± NC	1.0 ± NC	2.0 ± NC	2.0 ± NC	2.0 ± NC
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	0	0	0	1[b]	0	0	0	0
Body Weight (%)[c]	178.3 g	289.6 g	+5.2	-5.0	-2.4	-1.6	+0.6	-1.8
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.7C　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-1152 [資料4.2.3.2.4: TT#[redacted]-1152] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		25		50		1000	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings (Continued)								
Clinical Observations								
Post-Dose Salivation	0/10	0/10	[6/10][d]	[6/10][d]	[10/10][d]	[10/10][d]	[10/10][d]	[10/10][d]
Ophthalmic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Functional Observational Battery	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology	-	-	-	-	-	-	-	-

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.7C　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-1152 [資料4.2.3.2.4: TT#[redacted]-1152] (Continued)

a　No grazoprevir concentrations in plasma from control animals were the lower limit of quantitation (LLQ = 0.0134 µM) at 2 hours postdose.
b　Considered incidental (attributed to anesthetic accident).
c　At end of dosing period (Study Week 5).　For controls, group means are shown.　For dose groups, percent differences from controls are shown.
d　Transient and considered to be of minimal toxicological significance.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
#/# = Number affected/number examined.
F = Female; M = Male; N/A = Not applicable; NC = Not calculated.

Confidential

2.6.7.A.7D　反復投与毒性試験：ラットの1ヵ月間経口投与毒性試験（機能観察総合評価及び投与2週後の中間剖検を含む）

Test Article: Grazoprevir

Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han) **Initial Age:** ~6 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 2 mL/kg at each dosing session	**Duration of Dosing:** 1 month **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral (gavage) **Vehicle/Formulation:** 100% polyethylene glycol 400/ solution	**Study Number:** TT#[redacted]-1120 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120] **GLP Compliance:** Yes

Special Features: Functional observational battery assay (Study Day 1), interim necropsy in Study Week 3 (control group, 50-mg/kg/day, 200-mg/kg/b.i.d. groups) and evaluation of grazoprevir liver drug concentrations
No-Observed-Adverse-Effect Level: ≥200 mg/kg/b.i.d.

Daily Dose	0 (Control)/b.i.d.[a]		50 mg/kg/day		200 mg/kg/day		200 mg/kg/b.i.d.[a]	
Number of Animals	F:20[b]	M:20[b]	F:20[b]	M:20[b]	F:10	M:10	F:20[b]	M:20[b]
Toxicokinetics[c,d]								
Study Week 2								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	74.4	73.1	N/A	N/A	300	188
C_{max} (µM)	N/A	N/A	23.6	18.6	N/A	N/A	28.5	23.2
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2	2	N/A	N/A	2	1
Study Week 4								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	25.8	38.4	92.4	142	156	267
C_{max} (µM)	N/A	N/A	7.72	15.4	21.4	34.0	17.7	22.9
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2	2	1	2	8	2

Confidential

2.6.7.A.7D　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-1120 [資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)/b.i.d.[a]		50 mg/kg/day		200 mg/kg/day		200 mg/kg/b.i.d.[a]	
Number of Animals	F:20[b]	M:20[b]	F:20[b]	M:20[b]	F:10	M:10	F:20[b]	M:20[b]
Liver grazoprevir Concentrations (µM)[e]								
Study Week 3 (Interim Necropsy)	0	0	22.6	25.9	N/A	N/A	27.2	20.6
Study Week 5 (Final Necropsy)	[f]	[f]	20.6	19.7	14.7	13.2	34.3	16.7
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	1[g]	1[g]	0	0	0	1[f]	0	2[f]
Body Weight (%)[h]	163.6 g	291.0 g	+2.7	-1.9	+4.3	-5.1	+3.7	-8.1
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations								
Post-Dose Salivation	3/20	1/20	[20/20][i]	[20/20][i]	[10/10][i]	[10/10][i]	[20/20][i]	[20/20][i]
Ophthalmic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.7D　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-1120 [資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)/b.i.d.[a]		50 mg/kg/day		200 mg/kg/day		200 mg/kg/b.i.d.[a]	
Number of Animals	F:20[b]	M:20[b]	F:20[b]	M:20[b]	F:10	M:10	F:20[b]	M:20[b]
Noteworthy Findings (Continued)								
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Functional Observational Battery	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology	-	-	-	-	-	-	-	-

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.7D　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-1120 [資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120] (Continued)

a　Minimum of 6 hours between the 2 daily dosing sessions.
b　10 animals designated to Study Week 3 interim necropsy;　10 animals designated to final necropsy.
c　No grazoprevir concentrations in plasma from control animals above the lower limit of quantitation (LLQ = 0.0134 µM) at 2 hours postdose.
d　Blood samples collected in Study Week 2 from animals designated for interim necropsy (in control, 50-mg/kg/day and 200-mg/kg/b.i.d. groups) and in Study Week 4 on all remaining animals (in control, 50 and 100 mg/kg/day, and 200-mg/kg/b.i.d. groups).
e　Assuming liver density of 1.　Liver samples collected at interim necropsy in Study Week 3 (in control, 50-mg/kg/day and 200-mg/kg/b.i.d. groups) and at final necropsy in Study Week 5 from all remaining animals (in control, 50 and 100 mg/kg/day, and 200-mg/kg/b.i.d. groups).
f　Low levels of grazoprevir were measured in 1 male of 18 control animals in Study Week 3 (0.213 µM) and in 1 female and 1 male of 20 control animals in Study Week 5 at necropsy.　The liver concentrations were less than 0.9% of the low dose mean liver concentration.
g　Not test article-related (attributed to anesthesia, accident).
h　At end of dosing period (Study Week 4).　For controls, group means are shown.　For dose groups, percent differences from controls are shown.
i　Transient and considered to be of minimal toxicological significance.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
#/# = Number affected/number examined.
b.i.d. = bis in die; F = Female; LLQ = Lower limit of quantification (0.108 µM); M = Male; N/A = Not applicable.

Confidential

2.6.7.A.7E　反復投与毒性試験：ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験

Test Article: Grazoprevir

Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han) **Initial Age:** 5 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 2 mL/kg at each dosing session	**Duration of Dosing:** 6 months **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral (gavage) **Vehicle/Formulation:** 100% polyethylene glycol 400/Solution	**Study Number:** TT#[redacted]-6014 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.7: TT#[redacted]-6014] **GLP Compliance:** Yes
Special Features: Evaluation of grazoprevir liver concentrations. **No-Observed-Adverse-Effect Level:** ≥200 mg/kg/b.i.d.		

Daily Dose	0 (Control)/b.i.d.[a]		50 mg/kg/day		200 mg/kg/day		200 mg/kg/b.i.d.[a]	
Number of Animals	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15
Toxicokinetics								
Study Week 4[b]								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	108	63.2	476	260	390	232
C_{max} (µM)	N/A	N/A	21.0	18.1	62.9	36.3	60.1	39.6
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.0	2.0	2.0	2.0	8.0	8.0
Study Week 9[c]								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	105	116	563	179	392	341
C_{max} (µM)	N/A	N/A	29.4	18.1	60.0	30.1	40.6	37.2
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.0	2.0	2.0	1.0	2.0	8.0

Confidential

2.6.7.A.7E　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6014 [資料4.2.3.2.7: TT#[redacted]-6014] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)/b.i.d.[a]		50 mg/kg/day		200 mg/kg/day		200 mg/kg/b.i.d.[a]	
Number of Animals	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15
Toxicokinetics (Continued)								
Study Week 13[c]								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	88.0	119	321	419	365	525
C_{max} (µM)	N/A	N/A	20.4	29.5	40.0	52.9	29.0	43.0
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	8.0
Liver Grazoprevir Concentrations (µM)[d] - Final Necropsy	e	0	21.0	38.5	41.7	42.0	24.8	23.9
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	1[f]	1[g]	0	0	0	1[f]	1[f]	0
Body Weight (%)[h]	251.4 g	439.9 g	+3.4	+7.6	+2.5	+9.2	+3.1	+3.8
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations								
Post-Dose Salivation	7/15	12/15	[15/15]	[15/15]	[15/15]	[15/15]	[15/15]	[15/15]
Ophthalmic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.7E　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6014 [資料4.2.3.2.7: TT#[redacted]-6014] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)/b.i.d.[a]		50 mg/kg/day		200 mg/kg/day		200 mg/kg/b.i.d.[a]	
Number of Animals	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15
Noteworthy Findings (Continued)								
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry[i]	-	-	-	-	-	-	-	-
Total Bilirubin (mg/dL)								
Study Week 12	0.2	0.2	0.2	0.2	[0.2][j]	0.2	[0.2*][j]	[0.2][j]
Study Week 24	0.1	0.1	0.1	0.1*	[0.2][j]	0.1*	[0.2*][j]	0.1*
Sodium (mmol/L) – Study Week 24	143	-	142	-	143	-	[141*]	-
Chloride (mmol/L) – Study Week 24	104	-	104	-	104	-	[102*]	-
Potassium (mmol/L) – Study Week 24	4.0	-	4.0	-	4.0	-	[3.8]	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology (Incidence)	-	-	-	-	-	-	-	-
Stomach								
glandular mucosa, hemorrhage, focal	-	0/15	NE	NE	NE	0/15	-	[8/15]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.7E　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6014 [資料4.2.3.2.7: TT#[redacted]-6014] (Continued)

a　Generally 6- to 7-hours interval between the 2 daily dosing sessions.
b　Grazoprevir concentrations in plasma from control animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.013 µM) at 2 hours postdose.
c　Grazoprevir concentrations in plasma from control animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.014 µM) at 2 hours postdose.
d　Assuming liver density of 1.
e　Low levels of the test article was measured in 1 control female (0.271 µM). This liver concentration was less than 1% of the mean liver concentration of the low dose group. This had no impact on the quality and integrity of the study.
f　Not test article-related (attributed to complications of anesthesia, related to blood collection procedures).
g　Cause of death was not evident.
h　For controls, group means are shown.　For dose groups, percent differences from controls are shown.
i　Control and treatment group values are mean absolute values.　* = Statistically significant by Dunnett's test ($p \leq 0.05$).
j　Individual test article-related increases in a single female at 200 mg/kg/day (0.3 mg/mL in Study Weeks 12 and 24) and in both sexes at 200 mg/kg/b.i.d. (0.3 mg/mL or 0.4 mg/mL in 4 of 15 females in Study Weeks 12 and 24, and in 2 of 15 males in Study Weeks 12 only).

[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
#/# = Number affected/number examined.
F = Female; ILS = Investigative Laboratory Science; LLQ = Lower limit of quantification; M = Male; N/A = Not applicable; NE = Not examined.

Confidential

2.6.7.A.7F　反復投与毒性試験：イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験

Test Article: Grazoprevir

Species/Strain: Dog/Beagle **Initial Age:** 32 to 36 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 2 mL/kg	**Duration of Dosing:** 1 month **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral by capsule **Vehicle/Formulation:** 100% Polyethylene Glycol 400/Solution or suspension depending on dose	**Study Number:** TT#[redacted]-1151 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.9: TT#[redacted]-1151] **GLP Compliance:** Yes

Special Features: None
No-Observed-Adverse-Effect Level: 20 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		20		600	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Toxicokinetics[a]								
Study Day 1								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	76.3	60.6	544	566	1550	1560
C_{max} (µM)	N/A	N/A	11.9	11.1	41.8	43.8	99.6	110
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.0	2.0	4.0	3.3	4.2	4.0
Study Week 5								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	83.1	47.6	564	429	3300	2560
C_{max} (µM)	N/A	N/A	10.1	7.49	45.2	39.3	178	168
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.7	2.0	3.3	2.0	5.3	4.0

Confidential

2.6.7.A.7F　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-1151 [資料4.2.3.2.9: TT#[redacted]-1151] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		20		600	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[b]	8.8 kg	10.2 kg	+2.3	-2.9	0.0	-2.9	-3.4	-2.9
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations								
Emesis								
Liquid	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	[3/3]	[3/3]
Food	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	[1/3]	[1/3]
Foamy	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	[1/3]	[3/3]
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology[c]								
Red Blood Cells ($10^6/mm^3$) – Study Week 5	7.07	6.81	7.44	7.31	7.18	7.24	[6.88][d]	[7.05]
Hemoglobin (g/dL) - StudyWeek 5	16.4	15.7	16.8	16.6	16.5	16.3	[15.2][e]	[15.4]
Hematocrit (%) - StudyWeek 5	47.1	45.2	48.3	47.7	46.9	46.9	[43.5][f]	[44.6]
Reticulocytes (10^9/L) - StudyWeek 2	26.4	30.3	35.6	54.9	45.3	57.9	[24.9][g]	44.5
Reticulocytes (10^9/L) - StudyWeek 5	33.1	40.4	41.5	62.0	56.2	79.6	[99.3][h]	66.6

Confidential

2.6.7.A.7F　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-1151 [資料4.2.3.2.9: TT#[redacted]-1151] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		20		600	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Noteworthy Findings (Continued)								
Serum Biochemistry[i]								
Total Bilirubin (mg/dL) – Study Week 2	0.1	0.1	j	j	0.1	0.1	[0.5]	[0.3]
Total Bilirubin (mg/dL) – Study Week 5	0.1	0.1	0.1	j	0.1	[0.1][k]	[0.4]	[0.3]
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology (Incidence)								
Testes								
Seminiferous tubule degeneration	NE	0/3	NE	0/3	NE	0/3	NE	[3/3]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.7F　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-1151 [資料4.2.3.2.9: TT#[redacted]-1151] (Continued)

a　Grazoprevir concentrations in plasma from control group animals were below the lower limit of quantification (LLQ = 0.0134 µM).
b　At end of dosing period (Study Week 5).　For controls, group means are shown.　For dose groups, percent differences from controls are shown.
c　Control and treatment group values are mean absolute values.
d　Mainly due to Females #s 08-0501 and 08-0503, which showed decreases in red blood cells in Study Week 5 (6.75 [10^6/mm^3 and 6.17 16^6/mm^3, respectively).
e　Mainly due to Females #s 08-0501 and 08-0503, which showed decreases in hemoglobin in Study Week 5 (14.3/dL and 14.5 g/dL, respectively).
f　Mainly due to Females #s 08-0501 and 08-0503, which showed decreases in hematocrit in Study Week 5 (41.7% and 40.4%, respectively).
g　Mainly due to Female #08-0503 which showed a decrease in reticulocytes in Study Week 2 (12.4 [10^9/L]).
h　Mainly due to Female #08-0503 which showed a decrease in reticulocytes in Study Week 5 (25.8 [10^9/L]).
i　Control and treatment group values are mean absolute values.
j　Result is less than analytical limit.
k　One male (Animal #08-0510) from the 20-mg/kg/day group also had a very slight increase (0.2 mg/dL compared to pretest value of 0.1 mg/dL) in total bilirubin in Study Week 5.
- = No noteworthy findings.
#/# = Number examined/Number affected.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
F = Female; M = Male; N/A = Not applicable; NE = Not examined.

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験：イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験（投与3ヵ月後の中間剖検を含む）

Test Article: Grazoprevir

Species/Strain: Dog/Beagle **Initial Age:** 39 to 54 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 2 mL/kg	**Duration of Dosing:** 9 months **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral by capsule **Vehicle/Formulation:** 100% polyethylene glycol 400/Solution or suspension depending on dose	**Study Number:** TT#[redacted]-6015 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] **GLP Compliance:** Yes

Special Features: Three-month interim necropsy for the low dose group (3 female and 3 males) and evaluation of grazoprevir liver concentrations.
No-Observed-Adverse-Effect Level: 15 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Number of Animals	F:4	M:4	F:7[b]	M:7[b]	F:4	M:4	F:4	M:4
Toxicokinetics[c]								
Study Day 1[d]								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	83.7	78.3	472	352	2550	2470
C_{max} (µM)	N/A	N/A	10.9	11.1	44.6	35.0	138	142
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.1	1.3	1.8	2.5	7.0	6.0
Study Week 3								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1910	2980
C_{max} (µM)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	116	143
T_{max} (hr)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	4.5	5.0

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6015 [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Number of Animals	F:4	M:4	F:7[b]	M:7[b]	F:4	M:4	F:4	M:4
Toxicokinetics[c] (continued)								
Study Week 4[e]								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	86.3	54.8	382	289	N/A	N/A
C_{max} (µM)	N/A	N/A	12.8	9.08	35.9	27.8	N/A	N/A
T_{max} (hr)	N/A	N/A	1.7	1.4	2.5	2.5	N/A	N/A
Study Week 12[e]								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	69.8	68.9	431	303	3340	1900
C_{max} (µM)	N/A	N/A	11.2	10.6	42.1	26.7	200	126
T_{max} (hr)	N/A	N/A	1.6	1.7	2.5	2.6	5.3	5.3
Study Week 16								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1950	3030
C_{max} (µM)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	118	183
T_{max} (hr)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	2.7	4.0
Study Week 26								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	2420	2170
C_{max} (µM)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	150	133
T_{max} (hr)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	5.3	4.0

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6015 [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Number of Animals	F:4	M:4	F:7[b]	M:7[b]	F:4	M:4	F:4	M:4
Liver Grazoprevir Concentrations[f] (µM)								
Study Week 14 (Interim Necropsy)	N/A	N/A	5.80	3.83	ND	ND	ND[h]	ND[h]
Study Week 39 (Final Necropsy)[g]	0	0	5.15	7.13	33.9	44.6	93.3	178
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	-	-	-	-	-	-	[1][i]	[1][i]
Body Weight (%)[j]								
Study Week 11[k]	9.0 kg	10.5 kg	-11.1	-5.7	-3.3	+3.8	-3.3	-1.0
Study Week 39	10.2 kg	11.1 kg	-11.7	+4.5	-9.8	+10.8	-5.9	+6.3
Body Weight Change (kg)[l]								
Pretest to Study Week 7[m]	+0.1	+0.1	+0.1	+0.2	-0.4	0	[-0.5]	[-0.9]
Pretest to Study Week 11[n]	+0.3	+0.1	+0.1	+0.2	-0.2	+0.3	[-0.7]	[-0.2]
Pretest to Study Week 24	+0.3	+0.5	+0.4	+1	-0.1	+1.2	-0.3	[0][o]
Pretest to Study Week 39	+1.4	+0.5	+0.7	+1.6	+0.3	+1.6	+0.2	+1.0
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	[D]	[D]
Clinical Observations								
Feces, Unformed	P	P	P	P	P	P	[P, I]	P
Feces, Liquid	P	P	P	P	P	P	[P, I]	P
Feces, Yellow Discoloration	-	-	-	-	P	P	[P, I]	[P, I]
Emesis, postdose	P	P	P	P	P	P	[P, I]	[P, I]
Bulbar conjunctiva, yellow discoloration	-	-	-	-	-	-	-	[P][p]
Skin, Yellow Discoloration	-	-	-	-	-	-	-	[P][p]

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6015 [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Number of Animals	F:4	M:4	F:7[b]	M:7[b]	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings (Continued)								
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology[l,q]								
Erythrocyte count (10^6/dL)								
Study Week 3/4	6.68	7.03	6.69	7.12	6.91	7.05	[6.47][r,s]	[6.24][r]
Study Week11	7.23	7.31	7.36	7.54	7.64	7.58	[7.17][s]	[6.89]
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7.46	7.42
Study Week 26	7.15	7.64	6.85	7.89	7.35	7.70	7.22	[6.97]
Study Week 38	7.70	7.59	7.61	8.01	7.81	8.07	7.37	[8.34]
Nucleated erythrocytes								
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	[P][t]
Study Week 26	-	-	-	-	-	-	-	[P][t]
Study Week 38	-	-	-	-	-	-	[P][t]	[P][t]

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6015 [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Number of Animals	F:4	M:4	F:7[b]	M:7[b]	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings (Continued)								
Hematology[l,q] (Continued)								
Absolute reticulocyte count (10^9/L)								
Study Week 3/4	41.1	59.7	49.0	86.1	59.6	75.7	109.4	[58.5][r]
Study Week 11	51.1	45.1	50.6	67.9	48.1	63.7	[129.5][s]	[126.6][s]
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	55.3	81.5
Study Week 26	49.4	45.2	59.5	76.7	63.4	71.2	120.4	[410.2][t]
Study Week 38	65.2	49.8	42.7	80.7	53.4	75.2	[138.0][s,t]	[205.4][t]
Hemoglobin concentration (g/dL)								
Study Week 3/4	15.1	16.3	15.7	16.2	15.7	15.7	[13.9][r]	[13.7][r]
Study Week 11	16.7	17.0	17.6	17.3	17.4	16.9	[14.1]	[12.9]
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[14.4][r]	[13.3][r]
Study Week 26	16.3	17.7	16.1	17.8	16.4	16.6	[13.4]	[10.9]
Study Week 38	17.5	17.8	17.7	18.3	17.3	17.6	[13.2]	[13.6]

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6015 [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Number of Animals	F:4	M:4	F:7[b]	M:7[b]	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings (Continued)								
Hematology[l,q] (Continued)								
Hematocrit (%)								
Study Week 3/4	44.9	48.4	46.5	48.3	46.5	47.0	[41.7][r,s]	[40.0][r]
Study Week 11	49.1	50.6	51.4	51.0	51.4	50.0	[43.3]	[40.8]
Study Week16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[44.2][r]	[42.4][r]
Study Week26	46.3	50.7	46.2	51.4	47.1	48.0	[40.2]	[36.6]
Study Week 38	50.2	50.7	51.0	52.4	50.0	50.3	[40.0]	[41.5]
Mean corpuscular volume (fL)								
Study Week3/4	67.2	69.0	69.6	67.8	67.3	66.7	[64.7][r]	[64.2][r]
Study Week 11	67.9	69.4	69.8	67.7	67.2	66.1	[60.5]	[58.9]
Study Week16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[59.4][r]	[57.2][r]
Study Week 26	64.8	66.4	67.6	65.2	64.1	62.3	[56.1]	[54.4]
Study Week 38	65.1	66.9	67.0	65.5	64.0	62.5	[54.2]	[49.4]

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6015 [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Number of Animals	F:4	M:4	F:7[b]	M:7[b]	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings (Continued)								
Hematology[l,q] (Continued)								
Mean corpuscular hemoglobin (pg)								
Study Week3/4	22.6	23.1	23.5	22.7	22.7	22.3	[21.5][r]	[22.0][r]
Study Week 11	23.1	23.3	23.9	23.0	22.8	22.3	[19.7]	[18.7]
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[19.4][r]	[18.0][r]
Study Week 26	22.7	23.2	23.6	22.6	22.3	21.6	[18.8]	[16.1]
Study Week 38	22.7	23.4	23.3	22.8	22.2	21.9	[17.9]	[16.2]
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dL)								
Study Week 11	34.0	33.6	34.2	33.9	33.9	33.8	[32.6]	[31.8]
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[32.7][r]	[31.4][r]
Study Week 26	35.0	35.0	34.9	34.7	34.7	34.6	[33.4]	[29.9]
Study Week 38	34.9	35.0	34.8	34.8	34.6	35.0	[33.1]	[32.5]
Fibrinogen (mg/dL)								
Study Week 3/4	174.1	181.5	191.4	189.8	182.4	169.9	[297.9][r,s]	[343.8][r]
Study Week 11	166.0	263.2	159.7	214.8	198.5	243.3	[247.4][s]	[310.8][s]
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[250.0][r,s]	197.1

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6015 [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Number of Animals	F:4	M:4	F:7[b]	M:7[b]	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings (Continued)								
Hematology[l,q] (Continued)								
Platelet count ($10^3/\mu L$)								
Study Week 3/4	337	280	285	313	318	306	367	[386][r]
Study Week 11	369	291	343	313	360	326	[569]	[482]
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[532][r]	[497][r]
Study Week 26	351	250	347	322	386	329	[638]	[646]
Study Week 38	362	271	317	353	359	351	[537]	[530]
Serum Biochemistry[l,q]								
Total bilirubin (mg/dL)								
Study Week 3/4	0.1	0.1	0.1	0.1	[0.2][s]	0.1	[0.5][r]	[0.9][r]
Study Week 11	0.1	0.1	0.2	0.1	[0.3]	0.2	[0.4]	[1.1]
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[0.3][r]	[0.4][r]
Study Week 26	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	[0.2][s]	[0.3][s]	[0.5]
Study Week 38	0.2	0.1	0.2	0.2	[0.3]	[0.2][s]	[0.6]	[0.7]

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6015 [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Number of Animals	F:4	M:4	F:7[b]	M:7[b]	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings (Continued)								
Serum Biochemistry[l,q] (Continued)								
Alkaline phosphatase (IU/L)								
Study Week 3/4	62	64	74	76	73	73	75	[130][r,s]
Study Week 11	60	77	70	70	70	67	67	[248]
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[107][r,s]	[190][r]
Study Week 26	54	59	74	82	66	61	101	[210]
Study Week 38	54	71	73	84	59	61	81	[223]
Cholesterol (mg/dL)								
Study Week 3/4	130	99	122	100	132	100	[82][r,s]	[64][r]
Study Week 11	149	119	130	119	143	114	[130][s]	108
Study Week 16	NE	NE	NE	NE	NE	NE	104	[91][r,s]
Urinalysis								
Urine Bilirubin								
Study Week 11	-	-	-	-	-	-	[I]	[I]
Study Week 39	-	-	-	-	-	-	-	[I]

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6015 [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Interim Necropsy								
Number of Animals	F:0	M:0	F:3	M:3	F:0	M:0	F:0	M:0
Organ weights (%)	NE	NE	-	-	NE	NE	NE	NE
Gross Pathology	NE	NE	-	-	NE	NE	NE	NE
Histomorphology	NE	NE	-	-	NE	NE	NE	NE
Final Necropsy								
Number of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Organ Weights[u] (%)	-	-	-	-				
Liver (% Brain Weight)	291.0	337.4	+11.5	+15.9	-3.3	+15.2	[+42.5*]	[+40.3*]
Testes (% Brain Weight)	N/A	25.69	N/A	-4.7	N/A	[-14.5]	N/A	[-33.9*]
Gross Pathology (Incidence)								
Gallbladder, distended with abundant bile content	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[3/4]	[3/4]
Gingival Mucosa, yellow discoloration	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	[2/4]
White Adipose tissue, yellow discoloration	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	[2/4]
Aorta, yellow discoloration	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	[1/4]

Confidential

2.6.7.A.7G　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6015 [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		300/100[a]	
Number of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Histomorphology (Incidence)								
Liver								
Pigmentation	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	[3/4]
Bile duct, microlithiasis	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	0/4	[1/4]	0/4
Gallbladder								
Microlithiasis	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	[3/4]	[1/4]
Spleen								
Extramedullary hematopoiesis, increased	0/4	0/4	NE	NE	0/4	0/4	[1/4]	[1/4]
Pigmentation, increased	-	0/4	NE	NE	-	0/4	-	[2/4]
Bone Marrow								
Hyperplasia, erythroid	-	0/4	NE	NE	-	0/4	-	[1/4]
Testis								
Seminiferous tubule degeneration	N/A	0/4	N/A	0/4	N/A	[1/4]	N/A	[3/4]
Epididymis								
Sperm, decreased amount	N/A	0/4	N/A	NE	N/A	0/4	N/A	[3/4]

Footnotes on following page.

Confidential

a High dose was lowered to 100 mg/kg/day from Study Day 79 (Study Week 12).
b 3 dogs assigned to the 3-month interim necropsy.
c Grazoprevir toxicokinetic parameters were assessed on Study Day 1 (all groups), and in Study Weeks 3 (300-mg/kg/day group) or 4 (5-mg/kg/day and 15-mg/kg/day groups), 12 (all groups), 16 and 26 (300/100-mg/kg/day group).
d All grazoprevir concentrations in plasma from control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.013 µM).
e All grazoprevir concentrations in plasma from control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.014 µM).
f Assuming liver density of 1.
g All grazoprevir concentrations in liver from control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.104 µM).
h Individual liver grazoprevir concentrations in unscheduled death male #09-0192 in Study Week 7:　363 µM, Individual liver grazoprevir concentrations in unscheduled death female #10-0063 in Study Week 11:　356 µM.
i Sacrificed in Study Weeks 7 (male) and 11 (females) due to marked body weight loss and persistent inappetance.
j For controls, group means are shown.　For dose groups, percent differences from controls are shown.
k Before high dose lowering.
l Control and treatment group values are mean absolute values.
m Before early sacrifice of high-dose male #09-0192.
n Before early sacrifice of high-dose female #10-0003.
o Mainly due to high-dose male #10-0026 which lost weight between Study Weeks 22 and 24;　this animal regained weight following implementation of food supplementation.
p Observed in one male (yellow discoloration of the skin and eyes) prior to sacrifice in Study Week 7.
q For Study Week 3/4 examination of the high-dose group was brought forward from Study Week 4 to Study Week 3, due to early antemortem findings.　For Study Week 16, examination was performed only on the high-dose group, approximately 1 month after the lowering of the dose level.
r Change relative to mean or individual pretest value (no concurrent control value available in Study Weeks 3 and 16).
s Individual decreases/increases.
t Nucleated erythrocytes were observed notably in high-dose male #10-0004 in Study Week 26 and high-dose male #10-0012 in Study Week 38 and, to a lesser extent, in high-dose male #10-0012 in Study Week 16 and high-dose female #09-0193 in Study Week 38.
u Control values are the mean organ weight as a percent of brain weight; treatment group values are the mean percent change from concurrent controls of organ weight relative to brain weight.　Statistics performed sexes combined by Dunnett's Pairwise Comparison Test * = p ≤0.05.

#/# = Number affected/number examined.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
D = Decrease;　F = Female; I = Increase; ILS = Investigative Laboratory Science; M = Male; P = Present; N/A = Not applicable; NE = Not evaluated.

Confidential

2.6.7.A.8A　遺伝毒性試験 – In Vitro：細菌を用いる復帰突然変異試験

Test Article: Grazoprevir

Test for Induction of: Reverse mutation to wild type in bacteria cells **Strains:** *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA97a, TA98, and TA100), *Escherichia coli* (WP2 uvrA pKM101) **Metabolizing System:** Xenobiotic-induced rat liver S-9; 50 µL/plate **Treatment:** Approximately 48 hours	**No. of Independent Assays:** 1 **No. of Replicate Cultures:** 3 per dose point **No. of Cells Analyzed/Culture:** Not applicable **Vehicle for Positive Controls:** Solutions in DMSO or water depending on compound **Vehicle for Test Article**: DMSO	**Study No.**: TT#[redacted]-8000; TT#[redacted]-8011 **Location in CTD:** Section [資料4.2.3.3.1.1: TT#[redacted]-8000] **GLP Compliance**: Yes except for TT#[redacted]-8000 **Date of Treatment:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] for TT#[redacted]-8000 [redacted]-[redacted]-20[redacted] for TT#[redacted]-8011
Cytotoxic Effects: No inhibition of bacterial lawn growth was noted. Inhibition of revertant growth was noted at 5000 µg/plate in TA97a with metabolic activation. **Genotoxic Effects†:** None		

† Criteria for a positive result are (1) a 2-fold or greater increase in number of revertant colonies, and (2) a dose-related increase in number of revertant colonies.

Confidential

2.6.7.A.8A　遺伝毒性試験：In Vitro

Report Title: Microbial Mutagenesis Assay
Study No.: TT#[redacted]-8000 and TT#[redacted]-8011 [資料4.2.3.3.1.1: TT#[redacted]-8000] (Continued)

TT#[redacted]-8000	TA100[redacted]-[redacted]-20[redacted]				TA1535[redacted]-[redacted]-20[redacted]				TA97a[redacted]-[redacted]-20[redacted]			
	Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9	
Conc./Plate	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0 µg	152.8	14.0	171.6	12.0	13.9	4.4	11.6	2.8	205.1	15.0	271.8	22.6
30 µg	137.0	10.8	181.0	14.1	18.0	7.8	13.3	6.0	197.3	12.9	251.7	26.1
100 µg	145.7	10.0	148.0	18.7	17.0	4.4	16.3	4.5	182.3	13.1	268.7	8.4
300 µg	159.0	14.7	160.0	6.1	15.0	5.6	16.7	4.6	163.7	20.1	236.3	21.2
1000 µg	147.7	35.0	154.3	10.3	14.0	4.6	15.0	4.6	138.3	16.5	231.0	20.1
3000 µg	154.7	26.8	144.0*	4.6	8.3*	0.6	13.3*	7.1	143.0	26.1	201.7*	6.8
5000 µg	151.0	7.0	170.3*	13.3	15.0*	7.0	13.0*	4.4	149.0	16.6	189.0*	31.2
DMSO 100 µL	152.8	14.0	171.6	12.0	13.9	4.4	11.6	2.8	205.1	15.0	271.8	22.6
2AA 1.0 µg	152.3	5.9	762.0	58.0	13.3	5.0	89.3	11.2	191.0	11.4	671.3	32.7
2AA 2.0 µg	145.3	6.4	1578.3	83.0	16.3	4.5	159.3	24.0	221.0	9.6	1190.3	27.1
ICR-191 1.5 µg									1785.7	79.6		
Water 100 µL	155.0	2.6			15.7	6.8						
Sodium Azide 0.75 µg	522.0	40.0			350.7	27.3						

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.8A　遺伝毒性試験：In Vitro

Report Title: Microbial Mutagenesis Assay
Study No.: TT#[redacted]-8000 and TT#[redacted]-8011 [資料4.2.3.3.1.1: TT#[redacted]-8000] (Continued)

TT#[redacted]-8000	TA98[redacted]-[redacted]-20[redacted]				WP2 uvrA pKM101[redacted]-[redacted]-20[redacted]			
	Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9	
Conc./Plate	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0 µg	37.3	6.1	50.6	9.0	116.1	16.4	138.4	13.3
30 µg	37.7	10.1	45.3	11.9	128.0	30.1	139.3	6.1
100 µg	34.3	5.5	43.3	9.1	109.3	4.0	130.0	18.3
300 µg	35.0	7.0	42.0	8.7	109.3	18.5	122.0	3.5
1000 µg	37.0	8.5	38.0	4.4	92.0	9.5	109.3	6.7
3000 µg	50.0	7.2	50.0*	7.8	82.0	10.6	121.0*	21.9
5000 µg	46.0	13.9	33.3*	4.0	104.7*	8.6	99.0*	13.0
DMSO 100 µL	37.3	6.1	50.6	9.0	116.1	16.4	138.4	13.3
2AA 1.0 µg	41.3	5.1	456.3	27.4				
2AA 2.0 µg	50.0	2.0	1017.3	90.9	127.0	13.0	506.3	47.2
2AA 5.0 µg					101.7	13.3	1214.3	138.1
2-NF 1.0 µg	407.3	56.6						
4NQO 1.0 µg					569.3	119.0		

Salmonella typhimurium/E. coli genotypes:
TA100 his G46 (base substitution) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).
TA1535 his G46 (base substitution) ΔuvrB rfa.
TA97a his D6610 (frameshift) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).
TA98 his D3052 (frameshift) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).
WP2 uvrA pKM101 (*trp*$^-$) ΔuvrA pKM101 (R factor).
2AA = 2-Aminoanthracene.
2-NF = 2-Nitrofluorene.

S-9 = Metabolic activation.
SD = Standard deviation.
* = Precipitate; did not interfere with scoring.

DMSO = Dimethyl sulfoxide.
4NQO = 4-Nitroquinoline oxide.

Confidential

2.6.7.A.8A　遺伝毒性試験：In Vitro

Report Title: Microbial Mutagenesis Assay
Study No.: TT#[redacted]-8000 and TT#[redacted]-8011 [資料4.2.3.3.1.1: TT#[redacted]-8000] (Continued)

TT#[redacted]-8011	TA100[redacted]-[redacted]-20[redacted]				TA1535[redacted]-[redacted]-20[redacted]				TA97a[redacted]-[redacted]-20[redacted]			
	Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9	
Conc./Plate	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0 µg	188.7	20.0	205.8	20.3	27.8	7.2	27.7	5.8	229.7	19.7	311.4	33.5
100 µg	199.0	19.5	210.0	22.6	36.3	7.5	23.7	3.8	219.0	20.1	314.3	21.0
300 µg	202.7	13.3	186.3	4.9	29.3	9.5	22.7	6.8	210.0	22.5	300.3	18.5
1000 µg	159.7	8.1	177.7	13.3	29.3	7.0	33.7	6.7	195.3	23.1	252.3	22.2
3000 µg	174.3	14.2	186.7*	13.4	25.0	5.2	25.3	4.0	204.3*	5.0	268.3*	37.4
5000 µg	179.3*	12.0	181.0*	11.1	19.3*	3.8	29.0*	7.2	195.7*	14.0	238.7*	23.1

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.8A　遺伝毒性試験：In Vitro

Report Title: Microbial Mutagenesis Assay
Study No.: TT#[redacted]-8000 and TT#[redacted]-8011 [資料4.2.3.3.1.1: TT#[redacted]-8000] (Continued)

TT#[redacted]-8011	TA98[redacted]-[redacted]-20[redacted]				WP2 uvrA pKM101[redacted]-[redacted]-20[redacted]			
	Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9	
Conc./Plate	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0 µg	48.0	7.2	54.3	7.8	140.7	16.3	153.1	13.5
100 µg	42.3	4.2	46.7	8.0	150.0	7.0	162.3	20.2
300 µg	50.3	3.1	60.3	6.8	133.0	7.2	155.7	17.9
1000 µg	45.7	6.4	51.3	14.2	143.3	17.7	138.3	20.5
3000 µg	41.3*	4.7	49.7*	5.5	120.0*	27.8	138.7*	9.0
5000 µg	39.0*	11.5	48.7*	4.2	138.3*	1.5	128.7*	11.6

Salmonella typhimurium/E. coli genotypes:
TA100 his G46 (base substitution) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).
TA1535 his G46 (base substitution) ΔuvrB rfa.
TA97a his D6610 (frameshift) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).
TA98 his D3052 (frameshift) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).
WP2 uvrA pKM101 (*trp*$^-$) ΔuvrA pKM101 (R factor).

S-9 = Metabolic activation.
SD = Standard Deviation.
* = Precipitate, did not interfere with scoring.

Confidential

2.6.7.A.8A　遺伝毒性試験：In Vitro

Report Title: Microbial Mutagenesis Assay
Study No.: TT#[redacted]-8000 and TT#[redacted]-8011 [資料4.2.3.3.1.1: TT#[redacted]-8000] (Continued)

TT#[redacted]-8011 Mutagen†	S-9 +/-	Conc./ Plate	*Salmonella typhimurium* Strains							
			TA1535 Fold Inc		TA97a Fold Inc		TA98 Fold Inc		TA100 Fold Inc	
Sodium azide	-	0.75 µg	18.8		1.0		0.9		3.3	
ICR-191	-	1.5 µg	1.0		8.1		2.0		1.5	
2-Nitrofluorene	-	1.0 µg	1.0		1.5		9.5		3.2	
4NQO	-	1.0 µg	3.6		5.2		14.8		14.4	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
DMSO	-	100 µL	27.8	7.2	229.7	19.7	48.0	7.2	188.7	20.0
2AA	-	1.0 µg	25.0	3.6	239.0	8.2	48.0	12.3	199.7	9.0
2AA	-	2.0 µg	36.3	10.0	247.7	24.8	42.0	5.6	211.0	3.6
DMSO	+	100 µL	27.7	5.8	311.4	33.5	54.3	7.8	205.8	20.3
2AA	+	1.0 µg	120.3	17.6	736.7	69.2	489.0	5.6	902.7	30.7
2AA	+	2.0 µg	234.7	24.9	1489.3	8.4	1114.7	60.1	1857.7	13.7
Distilled Water	-	100 µL	25.0	4.0	242.7	30.7	48.0	10.4	220.0	7.0

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.8A　遺伝毒性試験：In Vitro

Report Title: Microbial Mutagenesis Assay
Study No.: TT#[redacted]-8000 and TT#[redacted]-8011 [資料4.2.3.3.1.1: TT#[redacted]-8000] (Continued)

TT#[redacted]-8011 Mutagen†	S-9 +/-	Conc./ Plate	*Escherichia coli* Strain WP2 uvrA pKM101 Fold Inc	
Sodium azide	-	0.75 µg	1.0	
ICR-191	-	1.5 µg	1.0	
2NF	-	1.0 µg	0.9	
4NQO	-	1.0 µg	6.1	
			Mean	SD
DMSO	-	100 µL	140.7	16.3
2AA	-	2.0 µg	154.3	7.1
2AA	-	5.0 µg	144.3	18.8
DMSO	+	100 µL	153.1	13.5
2AA	+	2.0 µg	469.7	21.9
2AA	+	5.0 µg	1169.3	84.5
Distilled Water	-	100 µL	147.0	26.5

† = Sodium azide was dissolved in water; all other compounds in DMSO.
SD = Standard Deviation.
S-9 = Metabolic activation.
^ = Slight inhibition of background lawn.
2AA = 2-Aminoanthracene.　DMSO = Dimethyl sulfoxide.　2NF = 2-Nitrofluorene.
4NQO = 4-Nitroquinoline oxide.

Confidential

2.6.7.A.8B　遺伝毒性試験 – In Vitro：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いる染色体異常試験

Test Article: Grazoprevir

Test for Induction of: Chromosome Aberrations **Strains:** Chinese Hamster Ovary cells, clone WBL **Metabolizing System:** Beta-naphthoflavone and phenobarbital-induced rat liver S9, 1.5% **Vehicle for Test Article:** Dimethylsulfoxide (DMSO) **Treatment:** Continuous treatment for 20 hours without S9; pulse treatment 3 hours with and without S9. Harvested 20 hours after beginning of treatment.	**No. of Independent Assays**: 1 **No. of Replicate Cultures:** 1 **No. of Cells Analyzed/Culture:** 200 except high-dose positive controls **Vehicle for Positive Controls:** Distilled water **Vehicle for Test Article**: DMSO	**Study No.:** TT#[redacted]-8686; TT#[redacted]-8600 **Location in CTD:** Section [資料4.2.3.3.1.2: TT#[redacted]-8600] **GLP Compliance:** Yes, TT#[redacted]-8686 was a range-finding (RF) study **Date of Treatment**: [redacted]-[redacted]-20[redacted] (TT#[redacted]-8686) and [redacted]-[redacted]-20[redacted] (TT#[redacted]-8600)
Cytotoxic Effects: See tables below. **Genotoxic Effects:** None†.		
† A test is considered positive if there are statistically significant increases ($p \leq 0.05$) over concurrent controls in the percentages of aberrant cells at 2 or more separate concentrations of test article without greatly exceeding a 50% reduction in growth. The analysis is a pairwise comparison of the percentage of cells with aberrations at each dose level with the controls by Fisher's Exact test with the p-values adjusted for multiple comparisons against a common control by the method of Dunnett. The tests with and without S-9 activation, and different treatment lengths are considered separately.		
Additional Comments Regarding Test: There was no evidence for any consistent or dose-related increase in polyploidy, and the maximum level of polyploidy and endoreduplication combined, 4.2%, is within the typical historical control range for this laboratory, 0.0 to 9.00%. Endoreduplication does not represent chromosome breakage. It is a form of polyploidy, and polyploidy is known to occur in several normal tissues in vivo. Endoreduplication in cultured cells occurs spontaneously and as a result of treatment with various agents. Possible mechanisms for endoreduplication include inhibition of normal DNA synthesis and/or temporary cell-cycle block in the G2 phase.		

Confidential

2.6.7.A.8B 遺伝毒性試験 – In Vitro

Study No.: TT#[redacted]-8686 and TT#[redacted]-8600 [資料4.2.3.3.1.2: TT#[redacted]-8600] (Continued)

TT#[redacted]-8600: Assay for Chromosomal Aberrations
Summary of Cytotoxicity and Aberrations at 20 Hours

Treatment	Cell Growth (PD, % Control)	% Aberrant Cells	Frequency Abs per 100 Cells[a]	% Endos[b]	% Polys[c]
With S-9 (3-Hour Treatment)					
DMSO (1%)	100	1.00	1.00	0.0	1.6
DMSO (1%)	100	1.50	1.50	0.0	1.8
Cyclophosphamide (5 µM)[d]	71	17.00	22.00		
Cyclophosphamide (10 µM)[e]	58	40.00**	54.00		
Grazoprevir (µM)					
10	78	NS			
20	85	2.00	2.00	0.4	3.2
25	65	0.50	0.50	0.0	1.6
30	58	NS			
40	54	NS			
50	46	1.00	1.00	0.0	1.6
60	28	NS			
80	21	NS			

Confidential

2.6.7.A.8B　遺伝毒性試験 – In Vitro　**Study No.:**　TT#[redacted]-8686;　TT#[redacted]-8600 [資料4.2.3.3.1.2: TT#[redacted]-8600] (Continued)

TT#[redacted]-8600:　Assay for Chromosomal Aberrations (Continued)
Summary of Cytotoxicity and Aberrations at 20 Hours

Treatment	Cell Growth (PD, % Control)	% Aberrant Cells	Frequency Abs per 100 Cells[a]	% Endos[b]	% Polys[c]
Without S-9 (3-Hour Treatment)					
DMSO (1%)	100	0.50	0.50	0.0	1.6
DMSO (1%)	100	1.00	1.50	0.0	1.6
Mitomycin C (0.5 µM)[e]	74	28.00	30.00		
Mitomycin C (1.5 µM)[f]	57	80.00**	180.00		
Grazoprevir (µM)					
10	103	NS			
20	95	0.00	0.00	0.0	1.8
25	88	NS			
30	78	2.50	4.50	0.0	1.4
40	59	NS			
50	52	2.50	2.50	0.4	1.8
60	38	NS			
80	0	NS			

Confidential

2.6.7.A.8B　遺伝毒性試験 – In Vitro　**Study No.:**　TT#[redacted]-8686;　TT#[redacted]-8600 [資料4.2.3.3.1.2: TT#[redacted]-8600] (Continued)

TT#[redacted]-8600:　Assay for Chromosomal Aberrations (Continued)
Summary of Cytotoxicity and Aberrations at 20 Hours

Treatment	Cell Growth (PD, % Control)	% Aberrant Cells	Frequency Abs per 100 Cells[a]	% Endos[b]	% Polys[c]
Without S-9 (20-Hour Treatment)					
DMSO (1%)	100	0.50	0.50	0.0	1.6
DMSO (1%)	100	1.50	1.50	0.0	1.4
Grazoprevir					
5 µM	97	NS			
10 µM	97	3.00	5.00	0.0	4.2
20 µM	73	2.00	2.00	0.0	1.4
25 µM	59	NS			
30 µM	55	4.00	4.50	0.2	1.6
40 µM	39	NS			
50 µM	28	NS			
60 µM	24	NS			

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.8B　遺伝毒性試験 – In Vitro　**Study No.:**　TT#[redacted]-8686;　TT#[redacted]-8600 [資料4.2.3.3.1.2: TT#[redacted]-8600] (Continued)

a　The total number of aberrations per 100 cells, since a cell may have more than one aberration.
b　The number of endoreduplicated metaphases based on 500 cells.
c　The number of polyploid metaphases based on 500 cells.
　200 cells scored for aberrations per point except where noted.
d　100 cells scored for aberrations.
e　50 cells scored for aberrations.
f　25 cells scored for aberrations.
**　A positive point that is statistically significant p≤0.01 compared to the relevant control group using a one-sided Fisher's exact test and is also outside the historical solvent control range.
Cyclophosphamide (CP) and Mitomycin C (MMC) are positive controls.
DMSO = Dimethyl sulfoxide; NS = Not scored; PD = Population doubling.

Confidential

2.6.7.A.9A　遺伝毒性試験 – In Vivo：ラットの小核試験

Test Article: Grazoprevir

Test for Induction of: Micronuclei in rat bone marrow polychromatic erythrocytes **Species/Strain:** Rat/Crl:WI(Han) **Age:** 5 weeks **Cells Evaluated:** Polychromatic erythrocytes (PCE) **No. of Cells Analyzed/Animal:** 2000 PCE	**Treatment Schedule:** 1 month **Sampling Time:** 24 hours after final dosing. Positive controls sampled at 24 hours from a separate single-dose study **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation**: 100% Polyethylene Glycol 400	**Study No.:** TT#[redacted]-8813 **Location in CTD:** Section [資料4.2.3.3.2.1: TT#[redacted]-8813] **GLP Compliance:** Yes **Date of Dosing**: [redacted]-[redacted]-20[redacted] through [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Dose Selection: The high dose was the limit dose for the micronucleus assay defined in international (ICH/OECD) guidances.		
Additional Comments Regarding Test: None		
Toxic/Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: Negative. In each sex, no dose group had a statistically significant increase in micronucleus frequency over concurrent control by pairwise comparison. There was also no evidence for a dose relation from the statistical trend test. The statistical analysis includes an adjustment for multiplicity of testing. The assay would usually be considered positive if a significant increase in the frequency of micronucleated PCE ($p<0.05$) occurred at a minimum of 2 dose levels when compared with the concurrent vehicle control mean: either 2 doses at a given sacrifice time or 1 dose at each of 2 sacrifice times. There were statistically significant increases in micronucleated PCE in positive control animals treated with mitomycin C.		
Evidence of Exposure: Toxicity and exposure data are described in the report for TT#[redacted]-1152 [資料4.2.3.2.4: TT#[redacted]-1152] [Sec. 2.6.6.A.3.4].		

Confidential

2.6.7.A.9A　遺伝毒性試験 – In Vivo　**Study No.:**　TT#[redacted]-8813 [資料4.2.3.3.2.1: TT#[redacted]-8813] (Continued)

Treatment Dose	Harvest Time (Hr)	Females				Males			
		Total PCE	Total MN-PCE	MN-PCE/ 1000 PCE[a]	Percent PCE[b]	Total PCE	Total MN-PCE	MN-PCE/ 1000 PCE[a]	Percent PCE[b]
100% PEG 400 2 mL/kg	24	20,000	38	1.9 ± 0.3	59.4 ± 3.5	20,000	29	1.5 ± 0.3	57.5 ± 3.3
Grazoprevir 25 mg/kg/day	24	10,000	26	2.6 ± 0.8	64.8 ± 5.4	10,000	13	1.3 ± 0.3	59.5 ± 5.2
Grazoprevir 50 mg/kg/day	24	10,000	34	3.4 ± 1.8	64.8 ± 8.5	10,000	15	1.5 ± 0.6	54.6 ± 3.0
Grazoprevir 1000 mg/kg/day	24	10,000	24	2.4 ± 0.4	60.7 ± 3.5	10,000	18	1.8 ± 0.5	54.9 ± 4.9
Mitomycin C 0.6 mg/kg	24	N/A	N/A	N/A	N/A	10,000	33	3.3 ± 0.9	65.9 ± 6.9
Mitomycin C 1.6 mg/kg	24	N/A	N/A	N/A	N/A	10,000	118	11.8 ± 4.9	62.7 ± 6.4

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.9A　遺伝毒性試験 – In Vivo　**Study No.:**　TT#[redacted]-8813 [資料4.2.3.3.2.1: TT#[redacted]-8813] (Continued)

a　Group mean ± standard error.
b　PCE as a percent of 1000 total erythrocytes.
PCE = Polychromatic erythrocytes; MN-PCE = Micronucleated PCE; N/A = Not applicable.
Mitomycin C-treated animals are from an exploratory study and were dosed once and harvested approximately 24 hours later.
Vehicle and test-article treated animals are dosed daily for the duration of the study and sampled one day after the last treatment.
Data shown are from 5 animals per treated group per sex and 10 animals per vehicle control group per sex, except for Mitomycin C dosed animals, where 5 males per dose were scored.
PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

2.6.7.A.9B　遺伝毒性試験 – In Vivo：ラットの小核試験

Test for Induction of: Micronuclei in rat bone marrow polychromatic erythrocytes **Species/Strain:** Rat/Crl:WI(Han) **Age:** 6 weeks **Cells Evaluated:** Polychromatic erythrocytes (PCE) **No. of Cells Analyzed/Animal:** 2000 PCE	**Treatment Schedule:** 2 weeks or one month **Sampling Time:** 24 hours after final dosing. Positive controls sampled at 24 hours from a separate single-dose study **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation**: 100% Polyethylene Glycol 400	**Study No.:** TT#[redacted]-8734 **Location in CTD:** Section [資料4.2.3.3.2.2: TT#[redacted]-8734] **GLP Compliance:** Yes **Date of Dosing**: [redacted]-[redacted]-20[redacted] through [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Dose Selection: The high dose, 200 mg/kg b.i.d. was expected to be associated with the highest exposure, the exposure at the limit dose, 1000 mg/kg/day being lower than at 200 mg/kg/day or 200 mg/kg b.i.d.		
Toxic/Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: Negative. In each sex, no dose group had a statistically significant increase in micronucleus frequency over concurrent control by pairwise comparison. There was also no evidence for a dose relation from the statistical trend test. The statistical analysis includes an adjustment for multiplicity of testing. The assay would usually be considered positive if a significant increase in the frequency of micronucleated PCE ($p<0.05$) occurred at a minimum of 2 dose levels when compared with the concurrent vehicle control mean: either 2 doses at a given sacrifice time or 1 dose at each of 2 sacrifice times. There were statistically significant increases in micronucleated PCE in positive control animals treated with mitomycin C.		
Evidence of Exposure: Toxicity and exposure data are described in the report for TT#[redacted]-1120 [資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120] [Sec. 2.6.6.A.3.6].		

Confidential

2.6.7.A.9B　遺伝毒性試験 – In Vivo　**Study No.:**　TT#[redacted]-8734 [資料4.2.3.3.2.2: TT#[redacted]-8734] (Continued)

Summary for Female and Male Crl:WI(Han) Rats (Vehicle Control and Grazoprevir-Treated Groups)

Sex	Treatment Dose	Group #	Necropsy							
			2 Weeks				1 Month			
			Total PCE	Total MN-PCE	MN-PCE per 1000 PCE (±SE)[a]	% PCE (±SE)[a,b]	Total PCE	Total MN-PCE	MN-PCE per 1000 PCE (±SE)[a]	% PCE (±SE)[a,b]
Females	100% PEG 400 2 mL/kg/b.i.d.	1	18,000	40	2.2 ± 0.6	60.8 ± 2.8	20,000	32	1.6 ± 0.3	64.9 ± 2.4
	Grazoprevir 50 mg/kg/day	2	10,000	10	1.0 ± 0.3	67.9 ± 5.4	10,000	17	1.7 ± 0.3	62.2 ± 4.1
	Grazoprevir 200 mg/kg/day	3	N/A	N/A	N/A	N/A	10,000	18	1.8 ± 0.5	59.2 ± 3.7
	Grazoprevir 200 mg/kg/b.i.d.	4	10,000	22	2.2 ± 0.7	59.7 ± 4.2	10,000	17	1.7 ± 0.2	63.3 ± 3.0
Males	100% PEG 400 2 mL/kg/b.i.d.	1	18,000	34	1.9 ± 0.4	62.5 ± 2.6	20,000	18	0.9 ± 0.2	63.4 ± 4.1
	Grazoprevir 50 mg/kg/day	2	10,000	22	2.2 ± 0.3	60.1 ± 3.5	10,000	19	1.9 ± 0.4	68.7 ± 8.4
	Grazoprevir 200 mg/kg/day	3	N/A	N/A	N/A	N/A	10,000	11	1.1 ± 0.4	63.7 ± 5.4
	Grazoprevir 200 mg/kg/b.i.d.	4	10,000	24	2.4 ± 0.7	65.2 ± 2.9	10,000	18	1.8 ± 0.7	63.8 ± 5.1

a　Group mean ± standard error.
b　PCE as a percent of 1000 total erythrocytes.
PCE = Polychromatic erythrocytes; MN-PCE = Micronucleated PCE; N/A = Not applicable; PEG = Polyethylene Glycol.
Vehicle and test-article treated animals are dosed once or twice (b.i.d.) daily for 2 weeks or 1 month and sampled one day after the last treatment.
Data shown are from 5 animals per treated group per sex per time point, 9 animals per vehicle control group per sex at the 2 week time point, and 10 animals per vehicle control group per sex at the 1 month time point.

Confidential

2.6.7.A.10　がん原性試験

In accordance with ICH S1A guidance, carcinogenicity studies were not conducted given that the human use of the grazoprevir is less than 6 months in duration and in the absence of any genotoxic signal in the battery of genotoxicity studies or proliferative signal in the chronic toxicity studies.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage (100% PEG 400/ Solution)	GD 6 through 20	0 b.i.d.[a], 50, 100, 200, 200 b.i.d.[a]	6F/group	**200 mg/kg b.i.d.**: No test article-related maternal or developmental toxicity. **200 mg/kg/day**: No test article-related maternal or developmental toxicity. **100 mg/kg/day**: No test article-related of maternal or developmental toxicity. **50 mg/kg/day**: No test article-related maternal or developmental toxicity.	TT#[redacted]-7055 [資料4.2.3.5.2.1: TT#[redacted]-7055]

[a] 6-hour interval between the 2 daily dosing sessions.
b.i.d. = bis in die; F = Female; GD = Gestation Day; PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (100% PEG 400[a]/ Solution or suspension)	1 day	25, 50, 100, 200, 425	3F/group	**425 mg/kg**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 0.385; C_{max} (µM): 0.0893; T_{max} (hr): 2.7. **200 mg/kg**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 16.4; C_{max} (µM): 2.40; T_{max} (hr): 5.0. **100 mg/kg**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 1.89; C_{max} (µM): 0.440; T_{max} (hr): 4.0.	TT#[redacted]-7047 [資料4.2.3.5.2.3: TT#[redacted]-7047]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (100% PEG 400[a]/ Solution or suspension)	1 day	25, 50, 100, 200, 425	3F/group	**50 mg/kg**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 0.457; C_{max} (µM): 0.0745; T_{max} (hr): 2.8. **25 mg/kg**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 0.327; C_{max} (µM): 0.0571; T_{max} (hr): 5.0.	TT#[redacted]-7047 [資料4.2.3.5.2.3: TT#[redacted]-7047] (Continued)

a　Dosing volume: 1 mL/kg.
F = Female; PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water[a] or imwitor 742/ polysorbate 80[b]/ Solution or suspension)	1 day	50, 200	3F/group	**200 mg/kg in 10% (w/w) Polysorbate 80 in deionized water**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 0.57; C_{max} (µM): 0.34; T_{max} (hr): 1.0. **50mg/kg in 10% (w/w) Polysorbate 80 in deionized water**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 0.06; C_{max} (µM): 0.04; T_{max} (hr): 0.83.	TT#[redacted]-7048 [資料4.2.3.5.2.4: TT#[redacted]-7048]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water[a] or imwitor 742/ polysorbate 80[b]/ Solution or suspension)	1 day	50, 200	3F/group	**200 mg/kg in Imwitor 742/ Polysorbate 80**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 21.7; C_{max} (μM): 11.1; T_{max} (hr): 1.7. **50 mg/kg in Imwitor 742/ Polysorbate 80**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 0.36; C_{max} (μM): 0.17; T_{max} (hr): 1.3.	TT#[redacted]-7048 [資料4.2.3.5.2.4: TT#[redacted]-7048] (Continued)

a　Dosing volume:　5 mL/kg.
b　Dosing volume:　1 mL/kg.
F = Female.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (100% PEG 400[a]/ Solution or suspension; or Imwitor 742/ Polysorbate 80[a]/ Solution or suspension)	1 day	200 b.i.d.b, 350c	4F/group	**200 mg/kg b.i.d. in 100% PEG400:** No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 691; C_{max} (µM): 76; T_{max} (hr): 10. **350 mg/kg in Imwitor 742/ Polysorbate 80:** No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 0.20; C_{max} (µM): 0.04; T_{max} (hr): 8. **200 mg/kg b.i.d. in Imwitor 742/ Polysorbate 80:** No unscheduled deaths. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 0.27; C_{max} (µM): 0.04; T_{max} (hr): 5.	TT#[redacted]-7049 [資料4.2.3.5.2.5: TT#[redacted]-7049]

a　Dosing volume: 1 mL/kg/dosing session.
b　Formulation in PEG 400:　6 hour-interval between the 2 daily dose; Formulation in Imwitor/Polysorbate 80:　4-hour interval between the 2 daily doses.
c　Formulation in Imwitor/Polysorbate 80.
b.i.d. = bis in die; F = Female; PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (100% PEG 400[a]/ Solution or Imwitor 742/ Polysorbate 80[a]/ Solution)	1 day on SD1 and 1 day on SD8	200 b.i.d.[b] in either 100% PEG 400 or imwitor 742/ polysorbate 80 (1:1)	3F/group	**200 mg/kg b.i.d. (4 hours apart) in 100% PEG400**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* On SDs 1 and 8, $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 902 and 902, respectively; C_{max} (µM): 88 and 92, respectively; T_{max} (hr): 9 and 7, respectively. **200 mg/kg b.i.d. (6 hours apart) in 100% PEG400**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* On SDs 1 and 8, $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 226 and 234, respectively; C_{max} (µM): 41 and 47, respectively; T_{max} (hr): 9 and 9, respectively.	TT#[redacted]-7046 [資料4.2.3.5.2.6: TT#[redacted]-7046]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (100% PEG 400[a]/ Solution or Imwitor 742/ Polysorbate 80[a]/ Solution)	1 day on SD1 and 1 day on SD8	200 b.i.d.[b] in either 100% PEG 400 or imwitor 742/ polysorbate 80 (1:1)	3F/group	**200 mg/kg b.i.d. (4 hours apart) in Imwitor 742/ Polysorbate 80**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* On SDs 1 and 8, $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 0.4 and 0.3, respectively; C_{max} (µM): 0.1 and 0.03, respectively; T_{max} (hr): 3 and 3, respectively. **200 mg/kg b.i.d. (6 hours apart) in Imwitor 742/ Polysorbate 80**: No unscheduled deaths. *Grazoprevir* On SDs 1 and 8, $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 0.2 and 0.3, respectively; C_{max} (µM): 0.02 and 0.1, respectively; T_{max} (hr): 1 and 6, respectively.	TT#[redacted]-7046 [資料4.2.3.5.2.6: TT#[redacted]-7046] (Continued)

a　Dosing volume: 1 mL/kg/dosing session.
b　4 or 6-hour inteval between the 2 daily dosing sessions.
b.i.d. = bis in die; F = Female; PEG = Polyethylene Glycol; SD = Study Day.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water[a]/SDF; or deionized water[a]/NF)	1 day	SDF: 200, 625; NF: 200, 480	3F/group	**625 mg/kg (SDF)**: No unscheduled deaths *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 50; C_{max} (µM): 10; T_{max} (hr): 3.0. **200 mg/kg (SDF)**: No unscheduled deaths *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 388; C_{max} (µM): 34; T_{max} (hr): 5.3.	TT#[redacted]-7044 [資料4.2.3.5.2.7: TT#[redacted]-7044]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water[a]/SDF; or deionized water[a]/NF)	1 day	SDF: 200, 625; NF: 200, 480	3F/group	**480 mg/kg (NF)**: No unscheduled deaths *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 0.3; C_{max} (μM): 0.06; T_{max} (hr): 0.5. **200 mg/kg (NF)**: No unscheduled deaths *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 0.3; C_{max} (μM): 0.04; T_{max} (hr): 0.5.	TT#[redacted]-7044 [資料4.2.3.5.2.7: TT#[redacted]-7044] (Continued)

a　Dosing volume: 1 mL/kg.
F = Female; NF = Nanomilled formulation containing 15% (w/v) of grazoprevir, 2.5% (w/v) Hydroxypropyl Cellulose-Super Low, 0.1% of Sodium Lauryl Sulfate, and 15% (w/v) of Sucrose in deionized water; SDF = Spray-dried formulation containing 50% (w/w) of grazoprevir (free acid) and 50% (w/w) of hydroxypropylmethylcellulose-phtalate.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Oral (100% PEG 400[a]/ Solution)	GD 7 through 20	0 b.i.d.[b], 50, 200; 200 b.i.d.[b]	18F/group for cesarean-section, 6F/group for toxico-kinetics	**Control b.i.d. and 200-mg/kg b.i.d. groups**: There was excessive vehicle-related toxicity in the control b.i.d. and 200-mg/kg b.i.d. groups due to the total volume of 100% PEG 400 administered (*i.e.*, 2 mL/kg/day). The vehicle-related toxicities resulted in a reduced number of available litters at cesarean-section in these 2 groups. Since the numbers of litters available in these 2 groups were less than the recommended number of litters in the ICH S5 (R2) guidances, the purpose of this study was changed to being a preliminary assessment of potential developmental toxicity in rabbits. *Grazoprevir (GD 15) at 200 mg/kg b.i.d.* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 3.61; C_{max} (μM): 0.440; T_{max} (hr): 6.0.	TT#[redacted]-7040 [資料4.2.3.5.2.10: TT#[redacted]-7040]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Oral (100% PEG 400/ Solution)	GD 7 through 20	0 b.i.d.[a], 50, 200; 200 b.i.d.[a]	18F/group for cesarean-section, 6F/group for toxico-kinetics	**200 mg/kg/day**: No test article-related maternal or developmental effects. *Grazoprevir (GD 15)* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 1.08; C_{max} (μM): 0.347; T_{max} (hr): 6.0. **50 mg/kg/day**: No test article-related maternal or developmental effects. *Grazoprevir (GD 15)* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 0.507; C_{max} (μM): 0.200; T_{max} (hr): 6.0.	TT#[redacted]-7040 [資料4.2.3.5.2.10: TT#[redacted]-7040] (Continued)

a　Dosing volume: 1 mL/kg/dosing session.
b　At least 4-hour inteval between the 2 daily dosing sessions.
b.i.d. = bis in die; GD = Gestation Day; PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (100% PEG 400[b]/ Solution)	7 days	25 b.i.d.[c], 50 b.i.d.[c], 100 b.i.d.[c], 125 b.i.d.[c]	3F/group	**125 mg/kg b.i.d.**: No unscheduled deaths. On the days of toxicokinetic blood collections, the majority of the animals had all food remaining at all time points evaluated. *Grazoprevir* On SDs 1 and 7, $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 139 and 3.22, respectively; C_{max} (µM): 17.0 and 0.571, respectively; T_{max} (hr): 8.7 and 4.7, respectively.	TT#[redacted]-7042 [資料4.2.3.5.2.8: TT#[redacted]-7042]

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (100% PEG 400[b]/ Solution)	7 days	25 b.i.d.[c], 50 b.i.d.[c], 100 b.i.d.[c], 125 b.i.d.[c]	3F/group	**125 mg/kg b.i.d.**: No unscheduled deaths. On the days of toxicokinetic blood collections, the majority of the animals had all food remaining at all time points evaluated. *Grazoprevir* On SDs 1 and 7, $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 139 and 3.22, respectively; C_{max} (μM): 17.0 and 0.571, respectively; T_{max} (hr): 8.7 and 4.7, respectively.	TT#[redacted]-7042 [資料4.2.3.5.2.8: TT#[redacted]-7042] (Continued)

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (100% PEG 400[b]/ Solution)	7 days	25 b.i.d.[c], 50 b.i.d.[c], 100 b.i.d.[c], 125 b.i.d.[c]	3F/group	**100 mg/kg b.i.d.**: No unscheduled deaths. On the days of toxicokinetic blood collections, the majority of the animals had all food remaining at all time points evaluated. *Grazoprevir* On SDs 1 and 7, $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 126 and 52.8, respectively; C_{max} (µM): 15.4 and 8.22, respectively; T_{max} (hr): 8.7 and 13, respectively.	TT#[redacted]-7042 [資料4.2.3.5.2.8: TT#[redacted]-7042] (Continued)

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number[a]**
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (100% PEG 400[b]/ Solution)	7 days	25 b.i.d.[c], 50 b.i.d.[c], 100 b.i.d.[c], 125 b.i.d.[c]	3F/group	**50 mg/kg b.i.d.**: No unscheduled deaths. On the days of toxicokinetic blood collections, the majority of the animals had all food remaining at all time points evaluated. *Grazoprevir* On SDs 1 and 7, $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 5.30 and 0.468, respectively; C_{max} (μM): 1.90 and 0.0323, respectively; T_{max} (hr): 7.3 and 7.0, respectively.	TT#[redacted]-7042 [資料4.2.3.5.2.8: TT#[redacted]-7042] (Continued)

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (100% PEG 400[b]/ Solution)	7 days	25 b.i.d.[c], 50 b.i.d.[c], 100 b.i.d.[c], 125 b.i.d.[c]	3F/group	**25 mg/kg b.i.d.**: No unscheduled deaths. On the days of toxicokinetic blood collections, the majority of the animals had all food remaining at all time points evaluated. *Grazoprevir* On SDs 1 and 7, $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 0.302 and 0.249, respectively; C_{max} (µM): 0.0379 and 0.0328, respectively; T_{max} (hr): 8.0 and 5.3, respectively.	TT#[redacted]-7042 [資料4.2.3.5.2.8: TT#[redacted]-7042] (Continued)

a Study conducted after the Preliminary Oral Developmental Toxicity Study in Rabbits (TT#[redacted]-7040) to explore a lower dosing volume.
b Dosing volume: 0.5 mL/kg/dosing session.
c 4-hour interval between the 2 daily dosing sessions.
b.i.d. = bis in die.; F = Female; PEG = Polyethylene Glycol; SD = Study Day.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water[b]/SDF)	5 days	100, 200, 400, 100 b.i.d.[c], 200 b.i.d.[d], 400 b.i.d.[d]	4F/group	**400 mg/kg b.i.d**: No unscheduled deaths. On days with TK blood collections, all animals had either all or three-fourths of their food remaining during the detailed food observations. On the remaining days with less detailed food observations, the amount of food remaining ranged from none to three-fourths, with the exception of some animals with all food remaining on a limited number of days. Yellow plasma, ranging in brightness from slight to bright yellow was observed. In general, the animals with the highest daily $AUC_{0-24\ hr}$ of grazoprevir were those animals most frequently observed with the yellow plasma. *Grazoprevir* On SDs 1 and 5, $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 640 and 863, respectively; C_{max} (μM): 47.0 and 56.9, respectively; T_{max} (hr): 9.0 and 7.5, respectively.	TT#[redacted]-7127 [資料 4.2.3.5.2.9: TT#[redacted]-7127]

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water[b]/SDF)	5 days	100, 200, 400, 100 b.i.d.[c], 200 b.i.d.[d], 400 b.i.d.[d]	4F/group	**400 mg/kg/day**: No unscheduled deaths. On days with TK blood collections, all animals had either all or three-fourths of their food remaining during the detailed food observations. On the remaining days with less detailed food observations, the amount of food remaining ranged from none to three-fourths. Yellow plasma, ranging in brightness from slight to bright yellow was observed. In general, the animals with the highest daily $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ of grazoprevir were those animals most frequently observed with the yellow plasma. *Grazoprevir* On SDs 1 and 5, $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM•hr): 507 and 2240, respectively; C_{max} (μM): 33.5 and 137, respectively; T_{max} (hr): 6.3 and 11, respectively.	TT#[redacted]-7127 [資料4.2.3.5.2.9: TT#[redacted]-7127] (Continued)

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water[b]/SDF)	5 days	100, 200, 400, 100 b.i.d.[c], 200 b.i.d.[d], 400 b.i.d.[d]	4F/group	**200 mg/kg b.i.d**: No unscheduled deaths. On days with TK blood collections, all animals had either all or three-fourths of their food remaining during the detailed food observations. On the remaining days with less detailed food observations, the amount of food remaining ranged from none to three-fourths, with the exception of some animals with all food remaining on a limited number of days. Yellow plasma, ranging in brightness from slight to bright yellow was observed. In general, the animals with the highest daily $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ of grazoprevir were those animals most frequently observed with the yellow plasma. *Grazoprevir* On SDs 1 and 5, $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM•hr): 1360 and 2290, respectively; C_{max} (μM): 87.5 and 119, respectively; T_{max} (hr): 8.5 and 12, respectively.	TT#[redacted]-7127 [資料4.2.3.5.2.9: TT#[redacted]-7127] (Continued)

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water[b]/SDF)	5 days	100, 200, 400, 100 b.i.d.[c], 200 b.i.d.[d], 400 b.i.d.[d]	4F/group	**200 mg/kg/day**: No unscheduled deaths. On days with TK blood collections, all animals had either all or three-fourths of their food remaining during the detailed food observations. On the remaining days with less detailed food observations, the amount of food remaining ranged from none to three-fourths. Yellow plasma, ranging in brightness from slight to bright yellow was observed. In general, the animals with the highest daily $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ of grazoprevir were those animals most frequently observed with the yellow plasma. *Grazoprevir* On SDs 1 and 5, $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM•hr): 516 and 684, respectively; C_{max} (μM): 36.7 and 62.7, respectively; T_{max} (hr): 6.8 and 4.8, respectively.	TT#[redacted]-7127 [資料4.2.3.5.2.9: TT#[redacted]-7127] (Continued)

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water[b]/SDF)	5 days	100, 200, 400, 100 b.i.d.[c], 200 b.i.d.[d], 400 b.i.d.[d]	4F/group	**100 mg/kg b.i.d. (4 hours apart)**: No unscheduled deaths. On days with TK blood collections, all animals had either all or three-fourths of their food remaining during the detailed food observations. On the remaining days with less detailed food observations, the amount of food remaining ranged from none to three-fourths. Yellow plasma, ranging in brightness from slight to bright yellow was observed. In general, the animals with the highest daily $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ of grazoprevir were those animals most frequently observed with the yellow plasma. *Grazoprevir* On SDs 1 and 5, $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM•hr): 213 and 821, respectively; C_{max} (μM): 16.7 and 48.9, respectively; T_{max} (hr): 4.8 and 6.3, respectively.	TT#[redacted]-7127 [資料4.2.3.5.2.9: TT#[redacted]-7127] (Continued)

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water[b]/SDF)	5 days	100, 200, 400, 100 b.i.d.[c], 200 b.i.d.[d], 400 b.i.d.[d]	4F/group	**100 mg/kg b.i.d. (6 hours apart)**: No unscheduled deaths. On days with TK blood collections, all animals had either all or three-fourths of their food remaining during the detailed food observations. On the remaining days with less detailed food observations, the amount of food remaining ranged from none to three-fourths. Yellow plasma, ranging in brightness from slight to bright yellow was observed. In general, the animals with the highest daily $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ of grazoprevir were those animals most frequently observed with the yellow plasma. *Grazoprevir* On SDs 1 and 5, $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM•hr): 254 and 650, respectively; C_{max} (μM): 26.9 and 40.3, respectively; T_{max} (hr): 9.0 and 8.5, respectively.	TT#[redacted]-7127 [資料4.2.3.5.2.9: TT#[redacted]-7127] (Continued)

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article:　Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number[a]
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water[b]/SDF)	5 days	100, 200, 400, 100 b.i.d.[c], 200 b.i.d.[d], 400 b.i.d.[d]	4F/group	**100 mg/kg/day**: No unscheduled deaths. On days with TK blood collections, all animals had either all or three-fourths of their food remaining during the detailed food observations. On the remaining days with less detailed food observations, the amount of food remaining ranged from none to three-fourths. *Grazoprevir* On SDs 1 and 5, $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 5.54 and 2.89, respectively; C_{max} (μM): 2.27 and 0.914, respectively; T_{max} (hr): 1.3 and 2.0, respectively.	TT#[redacted]-7127 [資料4.2.3.5.2.9: TT#[redacted]-7127] (Continued)

a　Study conducted after the Preliminary Oral Developmental Toxicity Study in Rabbits (TT#[redacted]-7040) to explore a potential alternative formulation.
b　Dosing volume:　5 mL/kg/dosing session
c　Both 4- and 6-hour inteval between the 2 daily dosing sessions were tested.
d　4 hour-inteval between the 2 daily dosing sessions.
b.i.d. = bis in die; F = Female; SD = Study Day; SDF = Spray-dried formulation containing 50% (w/w) of grazoprevir (free acid) and 50% (w/w) of hydroxypropylmethylcellulose-phtalate.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Intravenous (0.15% Polyvinyl-pyrrolidone K16-18/ 0.036% Deoxycholic Acid Sodium Salt/ 5% Mannitol in deionized Water/Nanosuspension)	SDs 1 to 5	0[a], 50, 100, 200	4F/group	**200 mg/kg/day**: Mean body weight loss between SDs 1 and 5 of 26 g (range: -75 to +28 g) compared to an average gain in placebo group of 2 g (range: -6 to +19 g) (body weight loss represented ~1% of the SD1 average body weights); slight decrease in daily food consumption. *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 273 **100 mg/kg/day**: No test article-related findings *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 128 **50 mg/kg/day:** No test article-related findings *Grazoprevir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 35	TT#[redacted]-7126 [資料4.2.3.5.2.11: TT#[redacted]-7126]

a　Control Group 1 = Saline.　Control Group 2 = Placebo for grazoprevir nanoformulation (0.15% Polyvinylpyrrolidone K16-18/ 0.036% Deoxycholic Acid Sodium Salt/ 5% Mannitol in Deionized Water).
F = Female; SD = Study Day.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Intravenous (0.15% polyvinyl-pyrrolidone K16-18/ 0.036% sodium deoxycholate/5 % mannitol in deionized water/Nanosuspension)	GD 7 through 20 GD 7 through 15 for toxicokinetics	0, 50, 100, 200	8F/group for cesarean-section, 4F/group for toxicokinetics	**200 mg/kg/day**: 2 females had clinical signs (*i.e.*, convulsion-like activity, lateral recumbency, decreased activity, and/or splayed legs) after dosing on GD 7 or 8 and died; remaining females euthanized and discarded (no toxicokinetic evaluation on these animals). **100 mg/kg/day**: No test article-related maternal or developmental effects. *Grazoprevir (GD 15)* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 83.3; C_{max} (μM): 76.3; T_{max} (hr): 0.080.	TT#[redacted]-7001 [資料 4.2.3.5.2.12: TT#[redacted]-7001]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ Dutch Belted	Intravenous (0.15% polyvinyl-pyrrolidone K16-18/ 0.036% sodium deoxycholate/5 % mannitol in deionized water/Nanosuspension)	GD 7 through 20 GD 7 through 15 for toxicokinetics	0, 50, 100, 200	8F/group for cesarean-section, 4F/group for toxicokinetics	**50 mg/kg/day**: No test article-related maternal or developmental effects. *Grazoprevir (GD 15)* $AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr): 25.0; C_{max} (µM): 27.4; T_{max} (hr): 0.19	TT#[redacted]-7001 [資料 4.2.3.5.2.12: TT#[redacted]-7001] (Continued)

F = Female; GD = Gestation Day; IV = Intravenous.

Confidential

2.6.7.A.12A　生殖発生毒性試験 – 雌雄ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験（経口投与）

受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Design similar to ICH 4.1.1? Yes **Species/Strain**: Rat/Crl:WI(Han) **Age at Study Start**: Females: ~10 weeks Males: ~12 weeks **Study Start Date**: [redacted]-[redacted]-20[redacted]	**Day of Mating:** GD 0 **Day of Cesarean-Section:** GD 15 to 17 **Method of Administration**: Oral gavage **Formulation:** Solution **Dosing Volume:** 2 mL/kg **Vehicle (Control):** 100% polyethylene glycol 400	**Study Number:** TT#[redacted]-7260 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.5.1.1: TT#[redacted]-7260] **GLP Compliance:** Yes

Special Features: For cohabitation, high-dose females housed with untreated males, high-dose males housed with untreated females, mid-dose females housed with mid-dose males, low-dose females housed with low-dose males, control females housed with control males.
Treatment Interval (females): 15 days prior to cohabitation, during cohabitation, and through GD 7 or until the day removed from cohabitation
Treatment Interval (males): 15 days prior to cohabitation, during cohabitation, and through one day prior to scheduled sacrifice (~6 weeks total)

No-Observed-Effect Level: ≥200 mg/kg b.i.d. (female and male fertility parameters; female and male general toxicity parameters)

No-Observed-Adverse-Effect Level: ≥200 mg/kg b.i.d. (female and male fertility parameters; female and male general toxicity parameters)

	Females				Males			
Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d.[a]	50	200	200 b.i.d.[a]	0 b.i.d.[a]	50	200	200 b.i.d.[a]
Toxicokinetics[b,c]								
$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	25.8	92.4	156	N/A	38.4	142	267
C_{max} (µM)	N/A	7.72	21.4	17.7	N/A	15.4	34.0	22.9
T_{max} (hr)	N/A	2.0	1.0	8.0	N/A	2.0	2.0	2.0

Confidential

2.6.7.A.12　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7260 [資料4.2.3.5.1.1: TT#[redacted]-7260] (Continued)

	Females				Males			
Daily dose (mg/kg)	0 b.i.d.[a]	50	200	200 b.i.d.[a]	0 b.i.d.[a]	50	200	200 b.i.d.[a]
Number of Animals	20	20	20	20	20	20	20	20
Noteworthy Findings								
Mortality	0	0	0	0	0	0	0	0
Physical Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.12A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7260 [資料4.2.3.5.1.1: TT#[redacted]-7260] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d.[a] F/ 0 b.i.d.[a] M	50 mkd F/ 50 mkd M	200 mkd F/ 200 mkd M	200 b.i.d.[a] F/ Untreated M	Untreated F/ 200 b.i.d.[a] M
Number of Animals	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
Noteworthy Findings (Continued)					
No. Females Cohabited	20	20	20	20	20
No. Females Bred	20	20	20	20	20
No. Pregnant Females	17	18	17	17	19
No. Nonpregnant Females	3	2	3	3	1
Time to Mating (4-day periods)	1.35	1.00	1.30	1.42	1.15
Mating Index (%)	100	100	100	100	100
Fecundity Index (%)	85	90	85	85	95
Fertility Index (%)	85	90	85	85	95

Confidential

2.6.7.A.12A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7260 [資料4.2.3.5.1.1: TT#[redacted]-7260] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d.[a] F/ 0 b.i.d.[a] M	50 mkd F/ 50 mkd M	200 mkd F/ 200 mkd M	200 b.i.d.[a] F/ Untreated M	Untreated F/ 200 b.i.d.[a] M
Number of Animals	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
Noteworthy Findings (Continued)					
Reproductive Parameters (Mean Values)					
No. Corpora lutea/pregnant female	13.1	13.7	14.0	12.9	13.2
No. Implantations/pregnant female	10.5	12.5	10.1	11.4	11.1
% Resorptions/implantations (L.M.)	3.7	3.1	10.3	4.5	4.0
% Dead fetuses/implantations (L.M.)	0	0.4	0	0.5	0.4
No. Live fetuses/pregnant female	10.1	12.1	9.2	10.9	10.5
% Peri-implantation loss (L.M.)	19.3	8.7	26.6	11.0	15.4
% Postimplantation loss (L.M.)	3.7	3.5	10.3	5.0	4.4

Confidential

2.6.7.A.12A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7260 [資料4.2.3.5.1.1: TT#[redacted]-7260] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d.[a] F/ 0 b.i.d.[a] M	50 mkd F/ 50 mkd M	200 mkd F/ 200 mkd M	200 b.i.d.[a] F/ Untreated M	Untreated F/ 200 b.i.d.[a] M
Number of Animals	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
Noteworthy Findings (Continued)					
Sperm Parameters (Mean Values ± S.D.)					
Sperm count/g cauda epididymis ($\times 10^6$)	829.4 ± 111.5	NE	NE	N/A	774.9 ± 82.1
Sperm motility (%)	91.1 ± 3.2	89.2 ± 3.9	89.7 ± 5.8	N/A	88.3 ± 8.0
Gross Examination[d]	-	-	-	N/A	-
Organ Weight					
Testes	-	-	-	N/A	-

Footnotes on following page.

Confidential

[a] The second daily dose was administered approximately 6 hours after the first dose; systemic exposure at 200 mg/kg b.i.d. is the maximum achievable exposure.
[b] Grazoprevir concentrations in plasma from all control group animals at 2 hours postdose were below the lower limit of quantitation of the bioanalytical method (LLQ = 0.0136 µM).
[c] Study Week 4 toxicokinetic data from One-Month Oral Toxicity Study in Rats with a Functional Observational Battery with a 2-Week Interim Necropsy (TT#[redacted]-1120) [資料4.2.3.2.6: TT#[redacted]-1120] [Sec. 2.6.6.A.3.6].
[d] Limited to examination of the thoracic and abdominal viscera of control and treated females and males.
– = No noteworthy findings.
b.i.d. = bis in die; F = Female; GD = Gestation Day; LLQ = Lower Limit of Quantitation; L.M. = Litter Mean; M = Male; mkd = mg/kg/day; N/A = Not applicable; NE = Not Evaluated; PMD = Premating Day; S.D. = Standard Deviation.
Mating Index = Mated females/females cohabited.
Fecundity Index = Pregnant females/mated females.
Fertility Index = Pregnant females/females cohabited.
% Peri-implantation loss = [(No. of corpora lutea – no. of implantations)/(no. of corpora lutea)] × 100.
% Postimplantation loss = [(No. of resorptions + no. of dead fetuses)/(no. of implantations)] × 100.

Confidential

2.6.7.A.13A　生殖発生毒性試験 – ラットの胚・胎児発生に関する試験（経口投与）

胚・胎児発生に対する作用

Test Article: Grazoprevir

Design Similar to ICH 4.1.3? Yes **Species/Strain:** Rat/Crl:WI(Han) **Age on GD 0:** ~10 weeks **Study Start Date:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Special Features:** Toxicokinetics, GD 15	**Day of Mating**: GD 0 **Day of Cesarean-Section**: GD 21 **Method of Administration:** Oral gavage **Formulation:** Solution **Dosing Volume:** 2 mL/kg **Vehicle (Control):** 100% polyethylene glycol 400	**Study Number**: TT#[redacted]-7050 Location in CTD: Vol. Section [資料4.2.3.5.2.2: TT#[redacted]-7050] GLP Compliance: Yes[a]

Treatment Interval: GD 6 through 20 (females scheduled for cesarean-section), GD 6 through 15 (females scheduled for TK blood collection)

No-Observed-Effect Level: ≥200 mg/kg b.i.d. (maternal toxicity); ≥200 mg/kg b.i.d. (developmental toxicity)

No-Observed-Adverse-Effect Level: ≥200 mg/kg b.i.d. (maternal toxicity); ≥200 mg/kg b.i.d. (developmental toxicity)

Daily dose (mg/kg)	0 b.i.d. (Control)[c]	50	200	200 b.i.d.[c]
Maternal Toxicokinetics (GD 15)[b]				
$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	160	133	217
C_{max} (µM)	N/A	23.4	17.2	48.1
T_{max} (hr)	N/A	2.0	2.0	8.0

Confidential

2.6.7.A.13A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7050 [資料4.2.3.5.2.2: TT#[redacted]-7050] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d. (Control)[c]	50	200	200 b.i.d.[c]
Number of Animals				
Total No. of Females	24	28	28	28
No. Females Scheduled for Cesarean-Section	20	20	20	20
Noteworthy Findings				
Mortality (No. of Females)	0	0	0	0
Physical Examinations	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Gross Examination[d]	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.13A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7050 [資料4.2.3.5.2.2: TT#[redacted]-7050] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d. (Control)[c]	50	200	200 b.i.d.[c]
Number of Animals				
Total No. of Females	24	28	28	28
No. Females Scheduled for Cesarean-Section	20	20	20	20
Noteworthy Findings (Continued)				
Reproductive Parameters (mean values)				
No. Litters evaluated	18	18	17	18
No. Corpora lutea/pregnant female	11.7	11.2	11.4	11.8
No. Implantations/pregnant female	9.6	10.2	9.9	10.1
% Resorptions/implantations (L.M.)	5.9	4.4	2.1	8.8
% Dead fetuses/implantations (L.M.)	0	0	0	0
No. Live fetuses/pregnant female	9.2	9.7	9.7	9.6
% Peri-implantation loss (L.M.)	17.6	9.1	12.8	16.7
% Postimplantation loss (L.M.)	5.9	4.4	2.1	8.8
Fetal sex ratios	0.44	0.51	0.50	0.51
Live Fetal Weights (g)				
Females	5.17	5.07	5.26	5.07
Males	5.48	5.42	5.56	5.34

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.13A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7050 [資料4.2.3.5.2.2: TT#[redacted]-7050] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d. (Control)[c]	50	200	200 b.i.d.[c]
Number of Animals				
Total No. of Females	24	28	28	28
No. Females Scheduled for Cesarean-Section	20	20	20	20
Noteworthy Findings (Continued)				
Placental Morphology				
No. abnormal placentas/total examined	0/166	0/175	0/165	0/182
Fetal Morphology				
External examination	-	-	-	-
Visceral examination	-	-	-	-
Coronal examination	-	-	-	-
Skeletal examination	-	-	-	-

a　With the exception of the GD 0 body weights and the micro-computed tomography for fetal skeletal evaluations.
b　Grazoprevir concentrations in plasma from all control group animals at 2 hours postdose were below the lower limit of quantitation of the bioanalytical method (LLQ = 0.0137 µM).
c　The second daily dose was administered approximately 6 hours after the first dose; systemic exposure at 200 mg/kg b.i.d. is the maximum achievable exposure.
d　Limited to examination of the thoracic and abdominal viscera.
– = No noteworthy findings.
#/# = number affected/number examined.
b.i.d. = bis in die; GD = Gestation Day; LLQ = Lower Limit of Quantitation; L.M. = Litter Mean; N/A = Not applicable; TK = Toxicokinetics.
Fetal sex ratio = [Total no. live female fetuses/(total no. live female fetuses + total no. live male fetuses)].
% Peri-implantation loss = [(No. of corpora lutea – no. of implantations)/(no. of corpora lutea)] × 100.
% Postimplantation loss = [(No. of resorptions + no. of dead fetuses)/(no. of implantations)] × 100.

Confidential

2.6.7.A.13B　生殖発生毒性試験 – ウサギの胚・胎児発生に関する試験（静脈内投与）

胚・胎児発生に対する作用

Test Article:　Grazoprevir

Design Similar to ICH 4.1.3?　Yes **Species/Strain:**　Rabbit/Dutch Belted **Age on GD 0:**　26 weeks **Study Start Date:**　[redacted]-[redacted]-20[redacted] **Special Features:**　Toxicokinetics, GD 15	**Day of Mating:**　GD 0 **Day of Cesarean-Section**:　GD 28 **Method of Administration:**　Intravenous **Dosing Volume:**　2 mL/kg **Injection Rate:**　1.5 mL/min	**Study Number:**　TT#[redacted]-7300 **Location in CTD:**　Vol.　Section [資料4.2.3.5.2.13: TT#[redacted]-7300] **GLP Compliance**:　Yes

Formulation:　Nanosuspension of grazoprevir in 0.15% polyvinylpyrrolidone K16-18/0.036% sodium deoxycholate/5% mannitol in deionized water

Placebo (Control Article):　0.15% polyvinylpyrrolidone K16-18/0.036% sodium deoxycholate/5% mannitol in deionized water

Treatment Interval:　GD 7 through 20 (females scheduled for cesarean-section), GD 7 through 15 (females scheduled for TK blood collection)

No-Observed-Effect Level:　≥100 mg/kg/day　(maternal toxicity); ≥100 mg/kg/day (developmental toxicity)

No-Observed-Adverse-Effect Level:　≥100 mg/kg/day[a] (maternal toxicity); ≥100 mg/kg/day (developmental toxicity)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	25	50	100
Maternal Toxicokinetics[b] (GD 15)				
$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	6.14	24.4	76.1
C_{max} (µM)	N/A	7.36	33.8	67.2
T_{max} (hr)	N/A	0.080	0.080	0.080

Confidential

2.6.7.A.13B 生殖発生毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-7300 [資料4.2.3.5.2.13: TT#[redacted]-7300] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	25	50	100
Number of Animals				
Total No. of Females	23	23	23	23
No. Females Scheduled for Cesarean-Section	19	19	19	19
Noteworthy Findings				
Mortality (No. of Females)	0	0	1[c]	2[d]
Physical Examinations	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Gross Examination[e]	-	-	-	-
Reproductive Parameters (Mean Values)				
No. Litters evaluated	17	19	18	15
No. Corpora lutea/pregnant female	7.1	7.3	7.7	6.9
No. Implantations/pregnant female	6.4	6.4	6.9	6.5
% Resorptions/implantations (L.M.)	8.2	0	4.4	1.9
% Dead fetuses/implantations (L.M.)	0	0	0	0
No. Live fetuses/pregnant female	5.9	6.4	6.6	6.4

Confidential

2.6.7.A.13B 生殖発生毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-7300 [資料4.2.3.5.2.13: TT#[redacted]-7300] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	25	50	100
Number of Animals				
Total No. of Females	23	23	23	23
No. Females Scheduled for Cesarean-Section	19	19	19	19
Noteworthy Findings (Continued)				
Reproductive Parameters (Mean Values) (Continued)				
% Peri-implantation loss (L.M.)	11.0	13.3	10.5	6.0
% Postimplantation loss (L.M.)	8.2	0	4.4	1.9
Fetal sex ratios	0.57	0.56	0.51	0.52
Live fetal weights (g)				
Females	31.2	31.9	31.6	30.8
Males	32.5	31.9	33.8	31.1
Placental Morphology				
No. abnormal placentas/total examined	0/101	0/121	0/118	0/96
Fetal Morphology				
External examination	-	-	-	-
Visceral examination	-	-	-	-
Coronal examination	-	-	-	-
Skeletal examination	-	-	-	-

Footnotes on following page.

Confidential

a　Maternal toxicity including test article-related unscheduled deaths was observed at 200 mg/kg/day in Preliminary Intravenous Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rabbits (TT#[redacted]-7001) [資料4.2.3.5.2.12: TT#[redacted]-7001] [Sec. 2.6.6.A.6.2.6].
b　Grazoprevir concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation of the bioanalytical method (LLQ = 0.013 μM).
c　One female euthanized after being found with a broken tooth and out of its caging presumably overnight.
d　One female euthanized due to excessive body weight loss; one female euthanized after aborted tissue found in cage pan.
e　Limited to examination of the thoracic and abdominal cavities.
– = No noteworthy findings.
#/# = Number affected/number examined.
GD = Gestation Day; LLQ = Lower Limit of Quantitation; L.M. = Litter Mean; N/A = Not applicable; TK = Toxicokinetics.
Fetal sex ratio = [Total no. live female fetuses/(total no. live female fetuses + total no. live male fetuses)].
% Peri-implantation loss = [(No. of corpora lutea – no. of implantations)/(no. of corpora lutea)] × 100.
% Postimplantation loss = [(No. of resorptions + no. of dead fetuses)/(no. of implantations)] × 100.

Confidential

2.6.7.A.14　生殖発生毒性試験：ラットの出生前及び出生後の発生毒性試験（経口投与）

出生前及び出生後の発生並びに母体機能に対する作用

Test Article: Grazoprevir

Design Similar to ICH 4.1.2? Yes **Species/Strain:** Rat/Crl:WI(Han) **Age at Study Start:** ~10 weeks **Study Start Date:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Day of Mating:** GD 0 **Treatment Interval (F_0 generation)**: GD 6 through LD 20	**Method of Administration:** Oral gavage **Formulation:** Solution **Dosing Volume:** 2 mL/kg **Vehicle (Control):** 100% polyethylene glycol 400 **Litters Culled/Not Culled**: Culled to 4/sex/litter on PND 3	**Study Number:** TT#[redacted]-7010 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.5.3.1: TT#[redacted]-7010] **GLP Compliance:** Yes

Special Features: For cohabitation of the F_1 generation (1 female:1 male; non-siblings), control group females were housed with control group males, low-dose group females were housed with low-dose group males, mid-dose group females were housed with mid-dose group males, high-dose group females were housed with control group males, and high-dose group males were housed with control group females.

No-Observed-Effect Level: ≥200 mg/kg b.i.d (F_0 generation); ≥200 mg/kg b.i.d (F_1 generation)

No-Observed-Adverse-Effect Level: ≥200 mg/kg b.i.d (F_0 generation); ≥200 mg/kg b.i.d (F_1 generation)

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d.[a]	25	100	200 b.i.d.[a]
Maternal Toxicokinetics (GD 15)[b]				
$AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr)	N/A	20.1	155	146
C_{max} (μM)	N/A	4.73	26.8	16.5
T_{max} (hr)	N/A	2.0	2.0	2.0
Number of F_0 Females at Study Start[c]	24	28	28	28

Confidential

2.6.7.A.14 生殖発生毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-7010 [資料4.2.3.5.3.1: TT#[redacted]-7010] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d.[a]	25	100	200 b.i.d.[a]
F_0 Generation - Delivery Arm[c]				
No. of Mated Females	20	20	20	20
No. of Pregnant Females	18	20	20	19
Mortality - No. of Females[d]	1	0	0	3
Physical Signs	-	-	-	-
Body Weight Gain	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Mean Length of Gestation (days)	21.8	21.7	21.8	21.8
No. of Pregnant Females Failing to Initiate/Complete Parturition	0	0	0	0
No. of F_0 Females with Live Pups on LD 0/LD 21	18/17	20/20	20/20	19/16
Gross Examination[e]	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.14 生殖発生毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-7010 [資料4.2.3.5.3.1: TT#[redacted]-7010] (Continued)

Daily Dose (mg/kg; F_0 Generation only)	0 b.i.d.[a]	25	100	200 b.i.d.[a]
F_1 Generation - preweaning				
No. of Parental Females	18	20	20	19
No. of Implantations/Pregnant Female	11.7	11.4	11.1	9.8
Total Pups Delivered	199	219	211	183
Live Pups/Litter on PND 0	11.1	11.0	10.6	9.6
No. Dead Pups on PND 0 (No. of Litters)	1 (1)	1 (1)	0	1 (1)
Sex Ratio	0.52	0.52	0.56	0.48
% Postimplantation Survival, L.M.	94.6	96.6	95.4	96.2
Pup External Morphology on PND 0	-	-	-	-
No. of Pup Deaths (No. of Litters)				
PND 1 to 3	1 (1)	2 (2)	2 (2)	1 (1)
PND 4 to 21	0	0	1 (1)	0
Live Pup Weights (g; Female/Male)				
PND 0	5.44/5.73	5.64/5.93	5.72/6.07	5.81/6.11
PND 7	15.3/15.7	15.7/16.2	16.3/16.9	15.8/16.1
PND 14	31.3/32.0	32.1/32.9	33.1/33.9	30.2/30.8
PND 21	47.8/49.3	49.0/50.6	49.2/51.2	45.9/46.9
Physical Signs	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.14 生殖発生毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-7010 [資料4.2.3.5.3.1: TT#[redacted]-7010] (Continued)

Daily Dose (mg/kg; F_0 Generation only)	0 b.i.d.[a]	25	100	200 b.i.d.[a]
F_1 Generation - postweaning				
No. of animals (Females/Males)	34/34	40/40	40/40	31/32
Mortality	0	0	0	1
Physical Signs	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-
Vaginal Opening (mean day of occurrence)	34.0	33.6	33.1	33.5
Preputial Separation (mean day of occurrence)	43.0	43.2	42.2	42.5
Behavioral Tests (~20/sex/group)				
Passive Avoidance	-	-	-	-
Auditory Startle Habituation	-	-	-	-
Open Field Motor Activity	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.14 生殖発生毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-7010 [資料4.2.3.5.3.1: TT#[redacted]-7010] (Continued)

Daily Dose (mg/kg; F_0 Generation only)	0 b.i.d. F/ 0 b.i.d. M	25 mkd F/ 25 mkd M	100 mkd F/ 100 mkd M	200 b.i.d. F/ 0 b.i.d. M	0 b.i.d. F/ 200 b.i.d. M
F_1 Generation - postweaning					
No. of Animals Cohabited (F/M)	17/17	20/20	19/19	16/16	16/16
No. Females Bred	17	20	19	16	16
No. Pregnant Females	13	19	19	14	13
No. Nonpregnant Females	4	1	0	2	3
Mean Time to Mating (in 4-day periods)	1.24	1.15	1.16	1.08	1.25
Reproductive Parameters (Mean Values) (Cesarean-section between GD 15 and 17)					
No. of Corpora Lutea/Pregnant Female	13.1	13.2	13.7	12.7	13.5
No. Implantations/Pregnant Female	12.0	11.1	13.2	10.9	13.0
% Resorptions/Implantations, L.M.	7.1	2.8	6.0	11.5	2.9
% Dead Fetuses/Implantations, L.M.	0	0	0	0	0
No. Live Fetuses/Pregnant Female	11.2	10.7	12.4	9.8	12.6
% Peri-implantation loss, L.M.	6.5	16.2	3.1	15.5	4.0
% Postimplantation loss, L.M.	7.1	2.8	6.0	11.5	2.9

Footnotes on following page.

Confidential

[a] The second daily dose was administered approximately 6 hours after the first dose; the 0 mg/kg b.i.d. group was the Control group; plasma systemic exposure to grazoprevir at 200 mg/kg b.i.d. is the maximum achievable exposure in this species.
[b] Grazoprevir concentrations in plasma from all control group animals at 2 hours postdose were below the lower limit of quantitation of the bioanalytical method (LLQ = 0.0132 μM).
[c] Twenty females were designated for delivery; 4 (control) or 8 females (drug-treated) were designated for blood collections for toxicokinetic analyses.
[d] Two females (1 in the control b.i.d. group and 1 in the 200 mg/kg b.i.d. group) were sacrificed on LD 0 due to prolapsed vaginas. Two females in the 200 mg/kg b.i.d. group were sacrificed on LD 1 due to insufficient litter sizes (i.e., litters with <4 pups). These unscheduled deaths were considered unrelated to MK-5172 treatment.
[e] Examination limited to the thoracic and abdominal viscera.
b.i.d. = bis in die; F = Female; GD = Gestation Day; LD = Lactation Day; L. M. = Litter Mean; M = Male; N/A = Not applicable; PND = Postnatal Day.
– = No noteworthy findings.
% Peri-implantation loss = [(No. of corpora lutea – no. of implantations)/(no. of corpora lutea)] × 100.
% Postimplantation loss = [(No. of resorptions + no. of dead fetuses)/(no. of implantations)] × 100.
% Postimplantation survival = [Live pups delivered/higher of (metrial glands or total pups delivered)] x 100.
Sex Ratio = Total no. of live female pups/total no. of live female and male pups.

Confidential

2.6.7.A.15　生殖発生毒性試験 – 出生児（幼若動物）投与／評価試験

Grazoprevir is not intended for administration to children in this filing. However, the grazoprevir nonclinical program (conducted in young animals, generally sexually immature at study initiation) and clinical program did not identify any major age-related safety concerns. Additionally, since grazoprevir is present in rat milk, juvenile rats were indirectly exposed to grazoprevir during lactation in the rat postnatal developmental toxicity study. Therefore, this nonclinical program is considered adequate to support the clinical development of a pediatric indication.

Confidential

2.6.7.A.16　局所刺激性試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Isolated Bovine Corneal	In vitro (MEM/Solution)	4 hours	0, 20%	N/A	Grazoprevir was classified as a non-irritant.	TT#[redacted]-7866 [資料4.2.3.6.1: TT#[redacted]-7866]
Rabbits/ New Zealand White	Dermal (moistened with distilled water)	4 hours	0.5 g/approx. 6-cm^2 site	3M	Grazoprevir is not a dermal irritant.	TT#[redacted]-7865 [資料4.2.3.6.2: TT#[redacted]-7865]

M = Male; MEM = Minumum Essential Medium; N/A = Not applicable.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験

免疫毒性試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ CBA/J	Dermal (DMF/Solution)	3 days	0, 5, 10, 25%	5F/group	Grazoprevir is not a dermal sensitizer.	TT#[redacted]-7864 [資料 4.2.3.7.2.1: TT#[redacted]-7864]

DMF = N, N-Dimethylformamide; F = Female.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ Jic:CB6F1-non TgrasH2@Jcl[a]	Oral/gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water/SDF[b])	Approx. 12 weeks followed by an approx. 12-week treatment free recovery period	0[c], 200, 500	50F, 50F/group[d]	**500 mg/kg/day:** Test article-related increases in serum and liver taurine conjugated bile acids (up to 39-fold and 9-fold in TCA in males and females in serum, and 2-fold only in TCA in males only in liver), and in serum total unconjugated bile acids (up to 19-fold), and up- or down-regulation in certain transcriptional endpoints for bile acid transport and metabolism genes in liver [Akr1b7, Abcc4 (Mrp4), and Abcc3 (Mrp3), and Slco1a1 (Oatp1)] were noted.	TT#[redacted]-9693 [資料 4.2.3.7.3.3: TT#[redacted]-9693]

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ Jic:CB6F1-non TgrasH2@Jcl[a]	Oral/gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water/SDF[b])	Approx. 12 weeks followed by an approx. 12-week treatment free recovery period	0[c], 200, 500	50F, 50F/group[d]	**500 mg/kg/day (Cont.):** These changes were noted throughout the dosing phase of the study, were dose related, and generally there was no increase in magnitude with treatment duration, except for the Slco1a1 (Oatp1) gene. SAA and certain serum cytokine endpoints (GRO/KC and IL-6) demonstrated sporadic multi-fold increases in individual high-dose mice which increased in incidence and magnitude over the dosing period, suggesting a potential test-article related relationship.	TT#[redacted]-9693 [資料 4.2.3.7.3.3: TT#[redacted]-9693] (Continued)

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Mouse/ Jic:CB6F1-non TgrasH2@Jcl[a]	Oral/gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water/SDF[b])	Approx. 12 weeks followed by an approx. 12-week treatment free recovery period	0[c], 200, 500	50F, 50F/group[d]	**500 mg/kg/day (Cont.):** At the end of the 12-week treatment free period, with the exception of the serum bile acids, there were no test article-related changes in any of the evaluated parameters, indicating that the changes noted above are fully reversible. The bile acid levels in females were also back to control levels, whereas in males they declined from peak levels but remained increased compared to controls, indicating a trend toward reversibility , which is not unexpected given that the serum bile acid increases in males were the highest during the treatment period.	TT#[redacted]-9693 [資料 4.2.3.7.3.3: TT#[redacted]-9693] (Continued)

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article:　Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ Jic:CB6F1-non TgrasH2@Jcl[a]	Oral/gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water/SDF[b])	Approx. 12 weeks followed by an approx. 12-week treatment free recovery period	0[c], 200, 500	50F, 50F/group[d]	**200 mg/kg/day**: Test article-related changes in certain transcriptional endpoints for bile acid transport and metabolism genes in liver, Akr1b7 and Slco1a1 (Oatp1) were noted. These changes were noted throughout the dosing phase of the study, were dose related, and there was no increase in magnitude with treatment duration for the except for the Akr1b7 gene. At the end of the 12-week treatment free period, there were no test article-related changes in any of the evaluated parameters, indicating that the changes noted above are fully reversible.	TT#[redacted]-9693 [資料 4.2.3.7.3.3: TT#[redacted]-9693] (Continued)

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ Jic:CB6F1-non TgrasH2@Jcl[a]	Oral/gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water/SDF[b])	Approx. 12 weeks followed by an approx. 12-week treatment free recovery period	0[c], 200, 500	50F, 50F/group[d]	**Conclusions**: The toxicological significance of changes in bile acids and transcriptional endpoints for bile acid transport and metabolism genes and SAA and cytokines is uncertain since the experience with these endpoints in response to a diverse set of test compounds with known outcome is limited. However the changes in bile acids and transcriptional endpoints for bile acid transport and metabolism genes suggest a potential *in vivo* reversible inhibition of biliary transporters.	TT#[redacted]-9693 [資料 4.2.3.7.3.3: TT#[redacted]-9693] (Continued)

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article:　Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Mouse/ Jic:CB6F1-non TgrasH2@Jcl[a]	Oral/gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water/SDF[b])	Approx. 12 weeks followed by an approx. 12-week treatment free recovery period	0[c], 200, 500	50F, 50F/group[d]	**Conclusions (Cont.)**: The SAA and cytokines are potential serum biomarkers of inflammation, non-specific to the liver. Their increases in serum from grazoprevir-treated rasH2 wild-type mice may correlate with the reversible inflammation observed in the gallbladder or small intestine in the 12-week oral biomarker study in rasH2 wild-type mice (hybrid) with a 12-week recovery period (TT#[redacted]-6034) [Sec. 2.6.7.A.18A].	TT#[redacted]-9693 [資料 4.2.3.7.3.3: TT#[redacted]-9693] (Continued)

a　Animals dosed in the Exploratory 12-Week Oral Biomarker Study in rasH2 Wild-Type Mice (Hybrid) with a 12-Week Recovery Period (TT#[redacted]-6034) [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] [Sec. 2.6.6.A.8.3.1.1]: Serum, liver, and ileum samples were transferred to this study to explore the utility of metabolics technology to detect potential test article-related changes in bile acids in serum and liver, transcriptional endpoints in liver and ileum for bile acid transport and metabolism genes, miRNA species (miR 122 and miR 192), High Mobility Group Box-1, and serum amyloid A, cytokines in serum.
b　SDF containing 50% (w/w) of grazoprevir (free acid) and 50% (w/w) of HPMCP in the vehicle (pH=7).
c　SDF containing 50 mg/mL of HPMCP (same amount as in high-dose animals) in the vehicle.
d　10 animals/sex/group assigned to each scheduled necropsy (Study Weeks 2, 4, 8, 12 and at the end of the recovery period, *i.e.* Study Week 25).
F = Female; SAA = Serum Amyloid A; SDF = Spray-dried Formulation; TCA = Taurocholic acid.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ C57BL/6 and BALB/c[a]	Oral/gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water/SDF[b])	1 month	0[c], 200, 500	10F, 10M/group/ strain	**500 mg/kg/day**: Test article-related changes consisted of increases in multiple serum taurine conjugated bile acid species, including TCA in C57BL/6 females and males (5.5-fold and 3.3-fold, respectively) and BALB/c males (3.0-fold); and up-regulations in Abcc3 (Mrp 3), Abcc4 (Mrp 4), and Akr1b7 and down-regulation in Slco1a1 (Oatp 1) in both strains, generally in both sexes, and an up-regulation in Cyp7a1 in BALB/c mice in both sexes.	TT#[redacted]-9709 [資料 4.2.3.7.3.4: TT#[redacted]-9709]

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article:　Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ C57BL/6 and BALB/c[a]	Oral/gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water/SDF[b])	1 month	0[c], 200, 500	10F, 10M/group/ strain	**500 mg/kg/day (Cont.)**: *Grazoprevir* At necropsy, in serum and liver (µM): In C57BL/6: 55.0 and 291.0, respectively; In BALB/c: 3.7 and 186.6, respectively. **200 mg/kg/day**: Test article-related up-regulation in Akr1b7 were observed in C57BL/6 males and in BALB/c females and males, and in Cyp7a1 in BALB/c females and males. Furthermore, a down-regulation in Slco1a1 (Oatp1) was noted in BALB/c females. *Grazoprevir* At necropsy, in serum and liver (µM): In C57BL/6: 1.8 and 143.0, respectively; In BALB/c: 1.0 and 116.2, respectively.	TT#[redacted]-9709 [資料 4.2.3.7.3.4: TT#[redacted]-9709] (Continued)

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Mouse/ C57BL/6 and BALB/c[a]	Oral/gavage (0.5% (w/v) methylcellulose/ 0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water/SDF[b])	1 month	0[c], 200, 500	10F, 10M/group/ strain	**Conclusions:** The toxicological significance of changes in bile acids, transcriptional endpoints for bile acids transport and metabolism genes is uncertain since the experience with these endpoints in response to a diverse set of test compounds with known outcome is limited. However they suggest evidence of a potential in vivo inhibition of biliary transporters in C57BL/6 and BALB/c mice.	TT#[redacted]-9709 [資料 4.2.3.7.3.4: TT#[redacted]-9709] (Continued)

a　Animals dosed in the Exploratory 1-Month Oral Toxicity Study in C57/BL6 and BALB/c mice (TT#[redacted]-6039) [資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039] [Sec. 2.6.6.A.8.3.1.2]: Serum, liver, and ileum samples collected also were transferred to this study to detect potential test article-related changes in bile acids in serum, transcriptional endpoints in liver for bile acid transport, and metabolism genes, miRNA species (miR 122 and miR 192) and SAA, and grazoprevir serum and liver concentrations at necropsy.
b　SDF containing 50% (w/w) of grazoprevir (free acid) and 50% (w/w) of HPMCP in the vehicle (pH=7).
c　SDF containing 50 mg/mL of HPMCP (same amount as in high-dose animals) in the vehicle.
F = Female; M = Male; SAA = Serum Amyloid A; SDF = Spray-dried Formulation; TCA = Taurocholic acid.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article:　Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/ Crl:WI(Han)[a]	Oral/gavage (PEG 400/ Solution)	6 months	0, 200 b.i.d.	15F, 15M/group	**200 mg/kg b.i.d.:** No test article-related changes in rat serum bile acids. **Conclusions**: There is no evidence of *in vivo* inhibition of biliary transporters in rats.	TT#[redacted]-9745 [資料 4.2.3.7.3.5: TT#[redacted]-9745]

[a] Animals dosed in the Six-Month Oral Toxicity Study in Rats (TT#[redacted]-6014) [資料4.2.3.2.7: TT#[redacted]-6014] [Sec. 2.6.6.A.3.7]: Remaining serum samples collected in Study Weeks 12 and 24 were transferred to this study to explore the utility of metabolics technology to detect potential test article-related changes in rat serum bile acid (control and high-dose groups analyzed only).

PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Dog/ Beagle[a]	Oral capsule[f] (PEG 400/ Solution)	9 months	0, 300/100[g]	4F, 4M/group	**300/100 mg/kg/day**: There were test article-related, statistically significant (P≤0.05) increases in total taurine conjugated bile acids including the most abundant bile acid, TCA, and total unconjugated bile acids at 300 mg/kg/day (up to 12-, 13-, and 7-fold, respectively). Following reduction of high dose to 100 mg/kg/day, compared to controls, there were still test article-related, statistically significant (P≤0.05) increases, but with lower magnitude, in total taurine conjugated bile acid including the most abundant bile acid, TCA, and total unconjugated bile acids (up to 5-, 6-, and 5-fold, respectively).	TT#[redacted]-9746 [資料 4.2.3.7.3.6: TT#[redacted]-9746]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

毒性発現の機序に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Dog/ Beagle[a]	Oral capsule[f] (PEG 400/ Solution)	9 months	0, 300/100[g]	4F, 4M/group	**Conclusions**: The toxicological significance of these increases remains unknown based on the limited experience in the evaluation of these endpoints. However, they suggest evidence of a potential in vivo inhibition of biliary transporters in dogs.	TT#[redacted]-9746 [資料 4.2.3.7.3.6: TT#[redacted]-9746] (Continued)

a Animals dosed in the Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 3-Month Interim Necropsy (TT#[redacted]-6015) [資料4.2.3.2.10: TT#[redacted]-6015] [Sec. 2.6.6.A.3.10]. Remaining serum samples collected in Study Weeks 3/4, 11, 26, and 38 to this study to explore the utility of metabolomics technology to detect potential test article-related changes in the dog serum bile acids (control and high-dose groups analyzed only).

PEG = Polyethylene Glycol; TCA = Taurocholic acid.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

免疫毒性試験

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/ Crl:LE (Long-Evans)	Oral gavage (PEG 400/ Solution)	3 days	50, 200 mg/kg b.i.d.[a] on SDs 1 and 2; 50 and 200 mg/kg on SD 3	Photoxicity Component: 5M/group Bioanalytical Component: 3M/group	No skin reactions or ocular observations indicative of phototoxicity.	TT#[redacted]-9002 [資料 4.2.3.7.7.1: TT#[redacted]-9002]

a　6 to 7 hours between the 2 daily doses.
b.i.d. = bis in die; hr = Hour;M = Male; PEG = Polyethylene Glycol; SD = Study Day.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

その他

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL[a] (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Monkey/ Rhesus	Oral gavage (100% PEG 400/ Solution)	7 days	10	1F/1M	≥10	No test article-related findings. *Grazoprevir (F/M)* $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM•hr): 0.61/0.70; C_{max} (μM): 0.15/0.23; T_{max} (hr): 2.0/2.0.	TT#[redacted]-1059 [資料4.2.3.7.7.3: TT#[redacted]-1059]

a　No Observed Adverse-Effect Level.
F = Female; M = Male; PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

2.6.7.A.17　その他の毒性試験（続き）

その他

Test Article: Grazoprevir

Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Human Whole Blood	In Vitro (20% (w/v) captisol, 5% (w/v) PEG 400 in 5 mM Tris buffer)	15 minutes	Placebo dilution: 1:512-1:1- Grazoprevir formulation: 0.00002-0.0107 mg/mL	N/A	No Hemolysis at any dose.	TT#[redacted]-7867 [資料 4.2.3.7.7.4: TT#[redacted]-7867]

N/A = Not applicable; PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

2.6.7.A.18A　その他の毒性試験：RasH2野生型マウス（交雑系）の12週間経口投与バイオマーカー検討試験及び12週間回復性試験

毒性発現の機序に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Species/Strain: Mice/Jic:CB6F1-nonTgrasH2@Jcl **Initial Age:** 8 or 9 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 10 mL/kg	**Duration of Dosing:** Approx. 12 weeks **Duration of Postdose:** Approx. 12 weeks **Method of Administration:** Oral (gavage) **Vehicle:** 0.5% (w/v) methylcellulose/0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water **Control Formulation:** SDF containing 50 mg/mL of HPMCP (same amount as in high-dose animals) in the vehicle **Grazoprevir Formulation**: SDF containing 50% (w/w) of Grazoprevir (free acid) and 50% (w/w) of HPMCP in the vehicle	**Study Number:** TT#[redacted]-6034 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] **GLP Compliance:** No

Special Features: Scheduled interim necropsies were performed after approximately 2, 4, 8, and 12 weeks of grazoprevir administration and then after an approximately 12-week treatment-free recovery period (10 mice/sex/group were assigned to a subgroup for each interim necropsy); transfer of serum, liver, and ileum samples to non-GLP ILS study (TT#[redacted]-9693) [資料4.2.3.7.3.3: TT#[redacted]-9693] [Sec. 2.6.6.A.8.3.2.1] to explore the utility of metabolics technology to detect potential test article-related changes in bile acids in serum and liver, transcriptional endpoints in liver and ileum for bile acid transport and metabolism genes, miRNA species (miR 122 and miR 192), High Mobility Group Box-1, and serum amyloid A in serum, cytokines in serum.

No-Observed-Adverse-Effect Level: 200 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500	
Number of Animals[a]	F:50	M:50	F:50	M:50	F:50	M:50
Noteworthy Findings						
Mortality (No. of Animals)[b]	1	0	1	1	4, [1]	6, [5]
Body Weight (%)[c]						
Study Week 12 (End of the dosing period)	24.7 g	31.1 g	-6.1	-10	-8.1	-16
Study Week 25 (End of the recovery period)	26.6 g	36.4 g	-4.5	-11	-1.9	-14

Confidential

2.6.7.A.18A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:50	M:50	F:50	M:50	F:50	M:50
Noteworthy Findings (Continued)						
Mortality (No. of Animals)[b]	1	0	1	1	4, [1]	6, [5]
Body Weight Change (g)[d]						
Pretest to Study Week 2	-0.1	+0.8	-0.1	[-0.6]	[-0.3]	[-1.2]
Pretest to Study Week 12	+2.9	+5.0	[+1.8]	[+1.9]	[+1.1]	[+0.0]
Pretest to Study Week 25	+5.0	+10.1	+3.9	[+6.1]	+4.4	[+5.3]
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.18A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:50	M:50	F:50	M:50	F:50	M:50
Noteworthy Findings (Continued)						
Serum Biochemistry[d,e,f]						
Albumin (g/dL)						
Study Week 3	3.3	3.4	3.2	[3.2*]	[3.1]	[3.2*]
Study Week 4/5	3.5/3.5	3.4/3.4	[3.3*/3.2*]	[3.3/3.2]g	[3.1*/3.2*]	[3.0*/3.0]
Study Week 8 (males/females)/ 9 (females)	3.4/3.4	3.4	[3.2*/3.3]g	3.3	[3.2*/3.1]	[3.2*]
Study Week 12/13	3.3/3.4	3.4/3.4	[3.2/3.2]g	[3.3/3.3]g	[3.1/3.2]	[3.1*/3.2*]
Aspartate Aminotransferase (IU/L)						
Study Week 3	122	92	117	75	[198*]	[135*]
Study Week 4/5	98/148	48/116	47/189	[54/141]g	[93/165]	[89*/216*]
Study Week 8 (males/females)/ 9 (females)	58/159	70	52/144	76	[84/240]	82
Study Week 12/13	55/142	59/97	53/156	[64/166]g	[83/283]	[85*/257*]
Alanine Aminotransferase (IU/L)						
Study Week 3	43	58	41	40	[115*]	[82]
Study Week 4/5	35/33	41/34	36/51	32/44	[109*/108*]	[78*/152*]
Study Week 8 (males/females)/ 9 (females)	23/51	36	32/63	52	[77*/190]	[64*]
Study Week 12/13	37/66	34/34	44/64	35/52	[95/169*]	[73*/135*]

Confidential

2.6.7.A.18A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:50	M:50	F:50	M:50	F:50	M:50
Noteworthy Findings (Continued)						
Serum Biochemistry[d,e,f] **(Continued)**						
Alkaline Phosphatase (IU/L)						
Study Week 3	136	112	123	107	125	[134*]
Study Week 4/5	112/125	84/98	114/121	[108*/109]	128/133	[118*/130*]
Study Week 8 (males/females)/ 9 (females)	95/98	80	107/117	[105*]	[130/139]	[139*]
Study Week 12/13	80/83	74/81	94/91	[92*/108*]	[102/118]	[123*/104*]
Study Week 16 (Recovery Week 4)	-	70	-	[78*]	-	[82*]
Total Bilirubin (mg/dL)						
Study Week 3	0.1	0.1	[0.2]g	[0.1]g	[4.0*]	[4.1*]
Study Week 4/5	0.1/0.1	0.1/0.1	[0.3*/0.2]	[0.3*/0.3*]	[2.7*/4.0*]	[3.2*/4.2*]
Study Week 8 (males/females)/ 9 (females)	0.1/0.1	0.1	[0.3/0.6]	[0.5*]	[2.0*/3.8]	[2.4*]
Study Week 12/13	0.1/0.1	0.1/0.1	[0.2/0.3]	[0.4*/0.2*]	[3.0/4.5*]	[3.4*/4.4*]

Confidential

2.6.7.A.18A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:50	M:50	F:50	M:50	F:50	M:50
Noteworthy Findings (Continued)						
Serum Biochemistry[d,e,f] **(Continued)**						
Glutamine Dehydrogenase Activity (U/L)						
Study Week 3	17.8	15.3	15.9	13.5	[42.4]	[28.0*]
Study Week 4/5	9.6/16.7	6.2/15.4	9.4/21.2	6.2/18.3	[37.8*/38.1]	[39.5*/36.0*]
Study Week 8 (males/females)/ 9 (females)	8.5/19.5	9.9	9.9/20.6	12.0	[28.9*/46.9]	[17.2*]
Study Week 12/13	8.6/15.1	6.5/12.9	9.1/19.0	7.2/17.8	[37.2/42.1*]	[15.0/32.3*]
Study Week 16	5.4	4.3	6.4	5.3	[7.2]	[6.4]
Organ Weights[g,h,f]						
Liver (% Brain Weight)						
Study Week 3	188.4	240.9	[205.5*]	[260.8*]	[250.0*]	[299.6*]
Study Week 5	181.3	247.4	[207.0*]	254.4	[242.2*]	[302.0*]
Study Week 8/9	191.3	242.2	[212.0*]	247.8	[265.6*]	[326.7*]
Study Week 13	209.5	264.9	217.6	249.9	[286.7*]	[340.1*]
Testes (% Brain Weight)						
Study Week 13	N/A	56.66	N/A	52.25	N/A	[36.78*]

Confidential

2.6.7.A.18A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:50	M:50	F:50	M:50	F:50	M:50
Gross Pathology (Incidence)[f]						
Liver, increased size						
Study Week 3	0/11[i]	0/10	0/11[i]	0/10	[11/11][i]	[10/12][i]
Study Week 5	0/10	0/10	[2/9]	[10/10]	[12/12][i]	[8/9][i]
Study Week 8/9	0/10	0/10	[1/10]	[4/10]	[10/10]	[6/11][i]
Study Week 13	0/10	0/10	0/10	[2/10][i]	[6/10][i]	[9/9]
Histomorphology[f,j] **(Incidence)**						
Liver						
Hepatocyte, increased size						
Study Week 3	0/10[i]	0/10	0/11[i]	0/10	[10/11][i]	[10/12][i]
Study Week 5	0/10	0/10	[2/9]	[10/10]	[12/12][i]	[8/9][i]
Study Week 8/9	0/10	0/10	[1/10]	[4/10]	[10/10]	[6/11][i]
Study Week 13	0/10	0/10	0/10	[2/10][i]	[6/9][i]	[9/9]
Cytoplasmic rarefaction						
Study Week 3	0/10[i]	0/10	1/11[i]	0/10	[6/11][i]	[0/12][i]
Study Week 5	1/10	0/10	[3/9]	0/10	[9/12][i]	0/9
Study Week 8/9	0/10	0/10	[6/10]	0/10	[9/10]	[1/11][i]
Study Week 13	0/10	0/10	[7/10]	0/10	[6/9]	[1/9]

Confidential

2.6.7.A.18A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:50	M:50	F:50	M:50	F:50	M:50
Histomorphology[f,j] (Incidence) (Continued)						
Gallbladder						
Cellular infiltration, neutrophilic						
Study Week 3	0/10[i]	0/10	0/11[i]	0/10	[6/11][i]	[1/12][i]
Study Week 5	0/10	0/10	[3/9]	0/10	[7/12][i]	[2/9]
Study Week 8/9	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[6/10]	[2/11][i]
Study Week 13	0/10	0/10	0/10	0/10	[4/9]	[2/9]
Erosion						
Study Week 3	0/10[i]	0/10	0/11[i]	0/10	[2/11][i]	[3/12][i]
Study Week 8/9	0/10	0/10	0/10	0/10	[2/10]	[1/11][i]
Study Week 13	0/10	-	0/10	-	[1/9]	-
Focal necrosis						
Study Week 13	-	0/10	-	0/10	-	[1/9]
Epithelial hyperplasia						
Study Week 5	0/10	-	0/9	-	[1/12][i]	-
Study Week 8/9	0/10	0/10	0/10	0/10	[5/10]	[2/11][i]
Study Week 13	0/10	0/10	0/10	0/10	[5/9]	[1/9]

Confidential

2.6.7.A.18A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:50	M:50	F:50	M:50	F:50	M:50
Histomorphology[f,j] (Incidence) (Continued)						
Small Intestine						
Epithelial vacuolation						
Study Week 3	0/10[i]	0/10	[2/11][i]	0/10	[8/11][i]	[4/12][i]
Study Week 5	0/10	0/10	[1/9]	[1/10]	[10/12][i]	[8/9]
Study Week 8/9	0/10	0/10	[4/10]	[1/10]	[9/10]	[8/11][i]
Study Week 13	0/10	0/10	[2/10]	[2/10]	[9/9]	[9/9]
Villus atrophy						
Study Week 3	0/10[i]	0/10	0/11[i]	0/10	[7/11][i]	[6/12][i]
Study Week 5	0/10	0/10	0/9	0/10	[10/12][i]	[8/9]
Study Week 8/9	0/10	0/10	0/10	0/10	[5/10]	[4/11][i]
Study Week 13	0/10	0/10	0/10	0/10	[6/9]	[8/9]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.18A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6034 [資料4.2.3.7.3.1: TT#[redacted]-6034] (Continued)

a　Ten/animals/sex/group were assigned to each necropy (approximately Study Weeks 2, 4, 8, 12 and at the end of the recovery period, i.e. Study Week 25).
b　Test article-related mortality is indicated in [ ].　The remaining unscheduled deaths in the control and 200-mg/kg/day groups as well as 4 female and 6 male unscheduled deaths in the 500-mg/kg/day group were due to intubation or anesthesia accidents.
c　For controls, group means are shown.　For treated-groups, percent differences from controls are shown.
d　Control and treatment group values are mean　absolute values.
e　Serum biochemical parameters limited to albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and glutamate dehydrogenase (GLDH) activities, and total/direct bilirubin.
f　There were no test article-related changes at the end of the recovery period.
g　Decreased/increased based on incidence and/or severity.
h　Control values are the mean organ weight as a percent of brain weight; treatment group values are the mean percent change from concurrent controls of organ weight relative to brain weight.
i　Including unscheduled deaths between the 2 scheduled necropsies.
j　The histomorphologic examination was performed on liver, gallbladder, small and large intestines, and Peyer's patches (when present in intestinal sections).
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
* = Statistically significant by Dunnett's test ($p \leq 0.05$).
F = Female; HPMCP = Hydroxypropylmethylcellulose phthalate; M = Male; N/A = Not applicable; NE = Not examined; P = Present; SDF = Spray-Dried Formulation.

Confidential

2.6.7.A.18B　その他の毒性試験：C57BL/6及び BALB/c マウスの1ヵ月間経口投与探索毒性試験

毒性発現の機序に関する試験

Test Article: Grazoprevir

Species/Strain: Mice/ C57BL/6 and BALB/c **Initial Age:** ~9 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 10 mL/kg	**Duration of Dosing:** 1 month **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral (gavage) **Vehicle:** 0.5% (w/v) methylcellulose/0.02% (w/v) sodium lauryl sulfate with 5 mM hydrochloric acid in deionized water **Control Formulation:** SDF containing 50 mg/mL of HPMCP (same amount as in high-dose animals) in the vehicle **Grazoprevir Formulation**: SDF containing 50% (w/w) of Grazoprevir free acid and 50% (w/w) of HPMCP in the vehicle	**Study Number:** TT#[redacted]-6039 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039] **GLP Compliance:** No
Special Features: Serum and liver samples collected at necropsy were transferred to ILS study (TT#[redacted]-9709) [資料4.2.3.7.3.4: TT#[redacted]-9709] [Sec. 2.6.6.A.8.3.2.2] to detect potential test article-related changes bile acids in serum and transcriptional endpoints in liver for bile acid transport and metabolism genes, miRNA species (miR 122 and miR 192) and Serum Amyloid A (SAA) in serum, and grazoprevir in serum and liver **No-Observed-Adverse-Effect Level:** 200 mg/kg/day		

Confidential

2.6.7.A.18B　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6039 [資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039] (Continued)

Species	C57BL/6						BALB/c					
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500		0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings												
Mortality (No. of Animals)[a]	0	0	0	0	[3]	[1]	0	0	0	0	[1]	[2]
Body Weight (%)[b]	21.2 g	24.2 g	-3.8	0	-4.7	-5.0	22.5 g	28.8 g	+5.8	+0.7	+0.9	-1.4
Body Weight Change (g)[c]												
Pretest to Study Week 1	+1.0	+0.4	[+0.4]	[+0.1]	[-0.8]	[-1.4]	+0.8	+0.6	[+0.1]	[-1.5]	[-0.7]	[-0.7]
Pretest to Study Week 5	+1.5	+1.6	[+0.8]	[+0.9]	[+0.5]	[-0.2]	+1.2	+2.0	[+2.3]	[+0.7]	+1.2	[-0.3]

Confidential

2.6.7.A.18B　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6039 [資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039] (Continued)

Species	C57BL/6						BALB/c					
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500		0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings (Continued)												
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry[c]												
Glucose (mg/dL)												
Study Week 1	190	137	222	148	202	[197*]	102	73	110	[107*]	[141*]	[121*]
Study Week 5/6[d]	222	127/229	209	143/229	214	146/132*	90	81/195	115	88/166	[156*]	[178*/ 216]
Total Protein (g/dL)												
Study Week 1	4.9	5.3	[4.5*]	4.9*	[4.7*]	5.2	4.7	5.0	4.5	4.8	[4.3*]	[4.6*]
Study Week 5/6[d]	4.8	5.1/5.1	[4.5*]	[4.9/4.7]	[4.5*]	[4.7*/4.5*]	4.5	4.7/4.7	4.6	4.9/4.8	4.4	5.0/4.7

Confidential

2.6.7.A.18B　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6039 [資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039] (Continued)

Species	C57BL/6						BALB/c					
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500		0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings (Continued)												
Serum Biochemistry (Continued)[c]												
Albumin (g/dL)												
Study Week 1	3.5	3.4	[3.1*]	3.2*	[3.2*]	3.4	3.2	3.2	[3.0*]	[3.0*]	[2.9*]	[2.9*]
Study Week 5/6[d]	3.4	3.3/ 3.4	[3.1*]	3.2/ 3.1	[3.1*]	[3.1*/ 3.0]	3.1	3.0/2.9	3.0	3.1/ 3.1	[2.9*]	3.2/ 3.1
Albumin/Globulin Ratio (g/dL)												
Study Week 1	2.4	-	2.3	-	2.3	-	2.2	-	[2.0*]	-	[2.0*]	-
Study Week 5/6[d]	2.3	-	2.2	-	[2.1*]	-	2.2	-	[2.0*]	-	[1.9*]	-
Alanine Aminotransferase (IU/L)												
Study Week 1	33	28	37	39	[55*]	[50*]	65	57	64	70	59	64
Study Week 5/6[d]	34	30/ 23	31	33/ 41	[51*]	[101*/ 39]	59	39/ 27	61	54/ 35	102	[213*/ 52*]
Alkaline Phosphatase (IU/L)												
Study Week 1	145	112	138	97	124	99	129	137	111*	111*	117	104*
Study Week 5/6[d]	110	89/ 77	125*	90/ 77	131*	108/ 104	108	104/94	121	127*/ 99*	[156*]	[162*/ 136*]

Confidential

2.6.7.A.18B　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6039 [資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039] (Continued)

Species	C57BL/6						BALB/c					
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500		0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings (Continued)												
Serum Biochemistry (Continued)[c]												
Cholesterol (mg/dL)												
Study Week 1	73	87	80	99	87	[114*]	82	103	[98*]	[135*]	[105*]	[132*]
Study Week 5/6[d]	65	74/ 78	67	93/ 83	70	[103*/ 80]	65	95/100	[90*]	[127*/ 137*]	[117*]	[161*/ 145*]
Triglycerides (mg/dL)												
Study Week 1	-	73	-	85*	-	83*	-	236	-	[161*]	-	[160*]
Study Week 5/6[d]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total Bilirubin (mg/dL)												
Study Week 1	0.1	0.1	[0.1*]	[0.3*]	[2.6*]	[3.1*]	0.1	0.1	[0.9*]	[0.2*]	[4.4*]	[3.4*]
Study Week 5/6[d]	0.1	0.0/ 0.1	0.1	[0.1*/ 0.1]	[0.4*]	[1.2*/ 0.3]	0.0	0.0/0.1	[0.2*]	[0.2*/ 0.2*]	[1.1*]	[1.6*/ 2.3*]

Confidential

2.6.7.A.18B　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6039 [資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039] (Continued)

Species	C57BL/6						BALB/c					
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500		0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings (Continued)												
Organ Weights[e] (%)												
Liver (% Brain Weight)	173.5	201.9	[+14.8]	[+9.2]	[+44.8]	[+28.7]	254.2	373.7	[+8.5]	[+11.2]	[+48.1]	[+34.9]
Gross Pathology (Incidence)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology (Incidence)												
Liver												
Hepatocyte, increased size	0/10	0/10	[5/10]	[10/10]	[8/10]	[9/10]	0/10	0/10	[7/10]	[10/10]	[8/10]	[10/10]
Periportal region, cytoplasmic rarefaction	0/10	-	0/10	-	[3/10]	-	0/10	-	0/10	-	[2/10]	-
Focal necrosis	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[2/10]	[1/10]	[3/10]	[2/10]
Mixed cellular infiltration, neutrophilic	0/10	-	0/10	-	0/10	-	0/10	-	[2/10]	-	[2/10]	-
Gallbladder												
Cellular infiltration, neutrophilic	0/10	-	[1/10]	-	0/10	-	0/10	-	0/10	-	0/10	-
Inflammation	-	0/10	-	0/10	-	[1/10]	-	0/10	-	0/10	-	0/10

Confidential

2.6.7.A.18B　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6039 [資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039] (Continued)

Species	C57BL/6						BALB/c					
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		200		500		0 (Control)		200		500	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings (Continued)												
Histomorphology (Incidence) (Continued)												
Kidney												
Tubule epithelial degeneration	0/10	0/10	0/10	0/10	[7/10]	[7/10]	0/10	0/10	0/10	0/10	[4/10]	[6/10]
Small Intestine												
Epithelial vacuolation	0/10	0/10	0/10	0/10	[2/10]	[7/10]	0/10	0/10	0/10	0/10	[4/10]	[5/10]
Villous atrophy	0/10	0/10	0/10	0/10	[4/10]	[6/10]	0/10	0/10	0/10	0/10	[3/10]	0/10

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.A.18B　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6039 [資料4.2.3.7.3.2: TT#[redacted]-6039] (Continued)

a　There were no gross or histological findings to explain the causes of death of animals in the 500-mg/kg/day dose group.　However, the deaths were considered test article-related based on incidence.
b　At end of dosing period (Study Week 5).　For controls, group means are shown.　For treated-groups, percent differences from controls are shown.
c　Control and treatment group values are mean absolute values.
d　In both strains, 3 males in the control and low-dose groups and 2 males in the high-dose group were sampled on the first day of Study Week 6.
e　Control values are the mean organ weight as a percent of brain weight; treatment group values are the mean percent change from concurrent controls of organ weight relative to brain weight.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
#/# = Number affected/number examined; * = Statistically significant by Dunnett's test ($p \leq 0.05$).
F = Female; HPMCP = Hydroxypropylmethylcellulose phthalate; M = Male; NE = Not examined; SDF = Spray-Dried Formulation.

Confidential

2.6.7.A.18C　その他の毒性試験：イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験

併用投与毒性試験

Test Article: Grazoprevir/Elbasvir

Species/Strain: Dog/Beagle **Initial Age:** 34 to 46 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** Grazoprevir: 2 mL/kg; Elbasvir: 5 mL/kg	**Duration of Dosing:** 1 month **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral Grazoprevir: capsules; Elbasvir: gavage **Vehicle/Formulation:** Grazoprevir: 100% PEG 400/Solution; Elbasvir: 10%(w/w) Polysorbate 80 in deionized water/Solution	**Study Number:** TT#[redacted]-6051 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051] **GLP Compliance:** Yes[a]
Special Features: Evaluation of grazoprevir and elbasvir liver concentrations **No-Observed-Adverse-Effect Level:** 5 mg/kg/day/25 mg/kg/day (Grazoprevir/Elbasvir)		

Grazoprevir/Elbasvir - **Daily Dose (mg/kg)**	0/0[b] (Control)		5/0[c]		0/25[d]		5/25	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Toxicokinetics[e] - Study Day 1								
Grazoprevir/Elbasvir - **$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)**	N/A	N/A	40.4/N/A	34.4/N/A	N/A/13.9	N/A/7.19	63.4/10.7	53.3/8.65
Grazoprevir/Elbasvir - **C_{max} (µM)**	N/A	N/A	6.14/N/A	6.79/N/A	N/A/0.886	N/A/0.563	5.82/0.742	5.42/0.606
Grazoprevir/Elbasvir - **T_{max} (hr)**	N/A	N/A	2.7/N/A	2.0/N/A	N/A/5.3	N/A/3.3	5.3/5.3	5.3/3.3

Confidential

2.6.7.A.18C　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6051 [資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051] (Continued)

Grazoprevir/Elbasvir - **Daily Dose (mg/kg)**	0/0[b] (Control)		5/0[c]		0/25[d]		5/25	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Toxicokinetics[e] - Study Week 5								
Grazoprevir/Elbasvir - **$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)**	N/A	N/A	35.4/N/A	25.2/N/A	N/A/9.87	N/A/5.66	71.1/14.7	49.3/4.48
Grazoprevir/Elbasvir - **C_{max} (µM)**	N/A	N/A	7.54/N/A	4.80/N/A	N/A/0.890	N/A/0.471	7.14/1.36	6.10/0.522
Grazoprevir/Elbasvir - **T_{max} (hr)**	N/A	N/A	2.3/N/A	2.0/N/A	N/A/3.3	N/A/3.0	2.7/3.3	4.7/2.7
Grazoprevir/Elbasvir **Liver Concentrations (µM)[f,g] - Final Necropsy**	N/A	N/A	8.52/N/A	3.88/N/A	N/A/6.60	N/A/5.49	13.4/8.38	10.1/4.25
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[h]	7.8 kg	9.6 kg	0.0	-3.1	2.6	3.1	-9.0	-3.1
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.A.18C　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6051 [資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051] (Continued)

Grazoprevir/Elbasvir - **Daily Dose (mg/kg)**	0/0[b] (Control)		5/0[c]		0/25[d]		5/25	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Noteworthy Findings (Continued)								
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis/Urine Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology (Incidence)								
Lymph node								
Lymphoid tissue, vacuolation	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-	[2/3]	-
Peyer's patches								
Lymphoid tissue, vacuolation	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-	[2/3]	-
Large Intestine								
Lymphoid tissue, vacuolation	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-	[1/3]	-

Footnotes on following page.

Confidential

a With the exception of the liver homogenate analysis of grazoprevir which was non-GLP due to insufficient coverage for long term and freeze-thaw cycles stability.
b 100% PEG 400 (capsules)/10% polysorbate 80 in deionized water (gavage).
c Grazoprevir (capsules)/10% polysorbate 80 in deionized water (gavage).
d 100% PEG 400 (capsules)/Elbasvir (gavage).
e Grazoprevir and elbasvir concentrations in plasma from control group animals were below the lower limit of quantitations (Grazoprevir LLQ = 0.013 μM; elbasvir LLQ = 0.023 μM).
f Assuming a liver density of 1.0.
g Grazoprevir and elbasvir concentrations in liver from control group animals were below the lower limit of quantitations (Grazoprevir LLQ = 0.104 μM; elbasvir LLQ = 0.227 μM).
h At end of dosing period (Study Week 4). For controls, group means are shown. For dose groups, percent differences from controls are shown.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
= Number examined/Number affected.
- = No noteworthy findings.
F = Female; M = Male; N/A = Not applicable; PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential

B 項：エルバスビル

2.6.7.B.1　毒性試験：一覧表

Test Article:　Elbasvir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Repeat-Dose Toxicity	Mouse/ Jic:CB6F1-non TgrasH2@jcl	Oral gavage	1 month	0, 10, 50, 300, 1000	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6047	[資料4.2.3.2.11: TT#[redacted]-6047]
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	7 days	0, 10, 100, 750	No	[redacted]	TT#[redacted]-2901	[資料4.2.3.2.12: TT#[redacted]-2901]
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	14 or 15 days	0, 100, 300; 1000 b.i.d.	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6014	[資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014]
Repeat-Dose Toxicocity[b]	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	15 days	100	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6017	[資料4.2.3.2.14: TT#[redacted]-6017]

Confidential

2.6.7.B.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Elbasvir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:WI(han)	Oral gavage	3 months	0, 50, 300, 1000	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6024	[資料4.2.3.2.15: TT#[redacted]-6024]
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:WI(han)	Oral gavage	6 months	0, 30, 300, 1000	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6033	[資料4.2.3.2.16: TT#[redacted]-6033]
Repeat-Dose Toxicity	Dog/ Beagle	Oral gavage	14 days	25	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6013	[資料4.2.3.2.17: TT#[redacted]-6013]
Repeat-Dose Toxicity	Dog/ Beagle	Oral gavage	3 months	0, 2, 25, 1000	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6025	[資料4.2.3.2.18: TT#[redacted]-6025]
Repeat-Dose Toxicity	Dog/ Beagle	Oral gavage	9 months	0, 5, 25, 1000	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6030	[資料4.2.3.2.19: TT#[redacted]-6030]

Confidential

2.6.7.B.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Elbasvir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Genotoxicity	Salmonella typhimurium TA1537, TA97a, TA98, TA100 and TA1535, and Escherichia coli WP2 uvrA pKM101, WP2 uvrA	In vitro	48 to 72 hours ±S-9	1.58 to 5000 µg/plate	Yes, except TT#[redacted]-8239	[redacted] MRL WP	TT#[redacted]-8239; TT#[redacted]-8060	[資料4.2.3.3.1.3: TT#[redacted]-8239]
Genotoxicity	Chinese Hamster Ovary Cells	In vitro	3 hours (+S-9); 3 hours (-S-9); 20 hours (-S-9)	1.5 to 40 µM	Yes	MRL WP	TT#[redacted]-8536	[資料4.2.3.3.1.4: TT#[redacted]-8536]

Confidential

2.6.7.B.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Elbasvir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Genotoxicity	Chinese Hamster Ovary Cells	In vitro	3 hours (+S-9); 3 hours (-S-9); 24 hours (-S-9)	1 to 5 µM	No	MRL WP	TT#[redacted]-8688	[資料4.2.3.3.1.5: TT#[redacted]-8688]
Genotoxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	14 or 15 days: bone marrow sampled the day after the final dose	0, 100, 300, 1000 b.i.d.	Yes	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-6014	[資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014]
Genotoxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	4 days: bone marrow sampled the day after the final dose	0, 30, 300	No	MRL WP	TT#[redacted]-8730	[資料4.2.3.3.2.3: TT#[redacted]-8730]

Confidential

2.6.7.B.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Elbasvir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	15 days prior to and during cohabitation (F/M), and through GD 7 (females) or for ~6 weeks total (males)	0, 50, 300, 1000	Yes	MRL WP	TT#[redacted]-7290	[資料4.2.3.5.1.2: TT#[redacted]-7290]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	GD 6 through 20	0, 30, 100, 300, 1000	No	MRL WP	TT#[redacted]-7175	[資料 4.2.3.5.2.14: TT#[redacted]-7175]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	GD 6 through 20 GD 6 through 15 for toxicokinetics	0, 50, 300, 1000	Yes	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-7170	[資料 4.2.3.5.2.15: TT#[redacted]-7170]

Confidential

2.6.7.B.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Elbasvir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage	GD 7 through 20	0, 30, 100, 300, 1000	No	MRL WP	TT#[redacted]-7185	[資料 4.2.3.5.2.16: TT#[redacted]-7185]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage	GD 7 through 20 GD 7 through 15 for toxicokinetics	0, 30, 100, 1000	Yes	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-7180	[資料 4.2.3.5.2.17: TT#[redacted]-7180]
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage	GD 6 through LD 20	0, 50, 300, 1000	Yes	MRL WP	TT#[redacted]-7020	[資料4.2.3.5.3.2: TT#[redacted]-7020]

Confidential

2.6.7.B.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Elbasvir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Local Tolerance	Isaloted Bovine Cornea	In vitro	4 hours	20% solution	Yes[d]	[redacted]	TT#[redacted]-7807	[資料4.2.3.6.3: TT#[redacted]-7807]
Local Tolerance	EpiDerm™ tissues	In vitro	1, 4, 24 hours	100 mg/ EpiDerm™ tissue	Yes[d]	[redacted]	TT#[redacted]-7806	[資料4.2.3.6.4: TT#[redacted]-7806]
Other Toxicity Studies	Mouse CBA/J	Dermal	3 days	5, 10, 25%	Yes[d]	[redacted]	TT#[redacted]-7805	[資料4.2.3.7.2.2: TT#[redacted]-7805]
Other Toxicity Studies	Rat/ Crl:LE (Long-Evans)	Oral gavage	3 days	100, 1000	Yes[d]	[redacted]	TT#[redacted]-9042	[資料4.2.3.7.7.5: TT#[redacted]-9042]

Confidential

2.6.7.B.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Elbasvir

Type of Study	Species and Strain	Method of Adminis-tration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Com-pliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Other Toxicity Studies	Dog/ Beagle	Oral gavage	1 month[c]	0, 1000	Yes	MRL WP MRL F	TT#[redacted]-1031	[資料4.2.3.7.7.6: TT#[redacted]-1031]
Other Toxicity Studies	Dog/ Beagle	Oral Grazoprevir: capsule; Elbasvir: gavage	1 month	0/5, 25/0, 25/5 (Elbasvir/ Grazoprevir)	Yes	MRL F	TT#[redacted]-6051	[資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051]
Other Toxicity Studies	Human Whole Blood	In vitro	15 minutes	0, 0.00002 to 0.01 mg/mL	No	MRL WP	TT#[redacted]-7800	[資料4.2.3.7.7.7: TT#[redacted]-7800]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article:　Elbasvir

a　For Repeat-Dose Toxicity, the NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect Level) is underlined.
b　Evaluation limited to toxicokinetics.
c　Followed by a three-month treatment-free period.
d　With the exception of the test article characterization which was non-GLP.
b.i.d. = Bis in die; GD = Gestation Day; LD = Lactation Day; SD = Study Day.
[redacted] = [redacted], U.S.A.
[redacted] = [redacted], U.S.A.
[redacted] = [redacted], Canada. [redacted] = [redacted], U.S.A.
MRL F = Merck Research Laboratories, Riom, France.
MRL WP = Merck Research Laboratories, West Point, Pennsylvania, U.S.A.

Confidential

2.6.7.B.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article:　Elbasvir

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Com-pliance	Study Number	Location Vol. Section
One-Month Range-Finding and Toxicokinetic	Mouse	Oral gavage	10, 50, 300, 1000	Yes	TT#[redacted]-6047	[資料4.2.3.2.11: TT#[redacted]-6047]
Seven-Day Tolerability	Rat	Oral gavage	10, 100, 750	No	TT#[redacted]-2901	[資料4.2.3.2.12: TT#[redacted]-2901]
Fourteen-Day Toxicity	Rat	Oral gavage	100, 300; 1000 b.i.d.	Yes	TT#[redacted]-6014	[資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014]
Fifteen-Day Toxicokinetic	Rat	Oral gavage	100	Yes	TT#[redacted]-6017	[資料4.2.3.2.14: TT#[redacted]-6017]
Three-Month Toxicity	Rat	Oral gavage	50, 300, 1000	Yes	TT#[redacted]-6024	[資料4.2.3.2.15: TT#[redacted]-6024]

Confidential

2.6.7.B.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表（続き）

Test Article:　Elbasvir

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Com-pliance	Study Number	Location Vol. Section
Six-Month Toxicity	Rat	Oral gavage	30, 300, 1000	Yes	TT#[redacted]-6033	[資料4.2.3.2.16: TT#[redacted]-6033]
Fourteen-Day Toxicity	Dog	Oral gavage	25	Yes	TT#[redacted]-6013	[資料4.2.3.2.17: TT#[redacted]-6013]
Three-Month Toxicity	Dog	Oral gavage	2, 25, 1000	Yes	TT#[redacted]-6025	[資料4.2.3.2.18: TT#[redacted]-6025]
Nine-Month Toxicity	Dog	Oral gavage	5, 25, 1000	Yes	TT#[redacted]-6030	[資料4.2.3.2.19: TT#[redacted]-6030]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表（続き）

Test Article:　Elbasvir

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Com-pliance	Study Number	Location Vol. Section
Developmental Toxicity	Rat	Oral gavage	50, 300, 1000	Yes	TT#[redacted]-7170	[資料4.2.3.5.2.15: TT#[redacted]-7170]
Developmental Toxicity	Rabbit	Oral gavage	30, 100, 1000	Yes	TT#[redacted]-7180	[資料4.2.3.5.2.17: TT#[redacted]-7180]
One-Month Toxicity with Three-Month Treatment-Free Period	Dog	Oral gavage	1000	Yes	TT#[redacted]-1031	[資料4.2.3.7.7.6: TT#[redacted]-1031]
One-Month Toxicity	Dog	Oral Grazoprevir: capsules; Elbasvir: gavage	0/5, 25/0, 25/5 (Elbasvir/Grazoprevir)	Yes[k]	TT#[redacted]-6051	[資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051]

b.i.d. = Bis in die.

Confidential

2.6.7.B.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表

Test Article:　Elbasvir

Steaty State AUC (µM•hr)

Daily Dose (mg/kg)	**Mouse Sexes Combined[a]**	**Rat Sexes Combined[a]**		**Dog Sexes Combined[a]**				**Female Rabbit**	**Human[b]**
	SW 4	**SW 2/3**	**SW 13**	**SW 2**	**SW 4/5**	**SW 13**	**SW 26**	**GD 15**	
0.83									2.775
2					0.182[i]				
5					0.911[j]	0.709[j]	0.892[j]		
10	2.90[c]								
25				16.0[h]	4.29[j] 5.96[i] 9.59[k]	4.15[j] 5.28[i]	4.11[j]		
30			3.64[g]					1.27[l]	
50	17.4[c]		4.36[f]						
100		6.88[d]						4.16[l]	
300	72.1[c]	11.1[e]	10.4[f] 15.1[g]						
1000	151[c]		17.3[f] 21.9[g]		18.9[j] 20.0[i]	19.1[j] 19.3[i]	16.6[j]	39.4[l]	
2000 (administered as 1000 mg/kg b.i.d.)		21.3[e]							

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表（続き）

Test Article:　Elbasvir

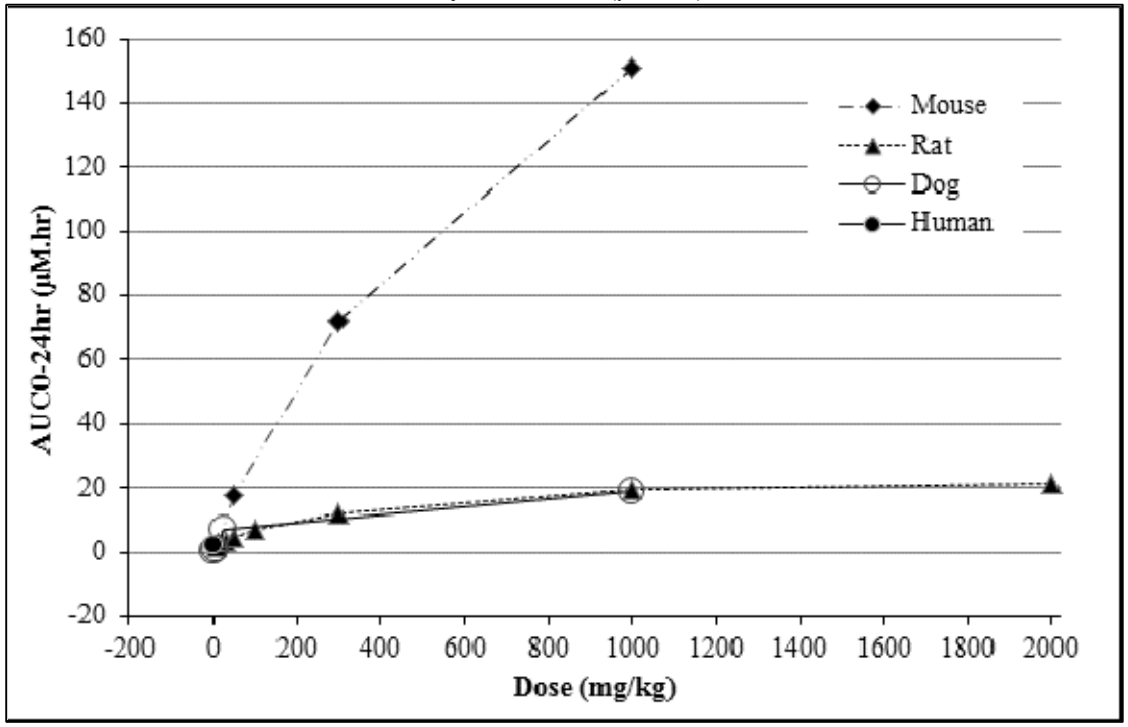
a　There was no substantial sex difference in elbasvir mean systemic exposure ($AUC_{0\text{-}24\ hr}$) and C_{max} values.
b　Clinical recommended dose is 50 mg.　The clinical daily dose is 0.83 mg/kg based on a 60-kg human weight with a corresponding $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ of 2.775 μM•hr.
c　One-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in rasH2 Wild-Type Mice (TT#[redacted]-6047) [資料4.2.3.2.11: TT#[redacted]-6047] [Sec. 2.6.6.B.3.1].
d　Fifteen-Day Oral Toxicokinetic Study in Rats (TT#[redacted]-6017) [資料4.2.3.2.14: TT#[redacted]-6017] [Sec 2.6.6.B.3.4].
e　Fourteen-Day Oral Toxicity Study in Rats with Micronucleus and Functional Observational Battery Assays (TT#[redacted]-6014) [資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014] [Sec. 2.6.6.B.3.3].
f　Three-Month Oral Toxicity Study in Rats (TT#[redacted]-6024) [資料4.2.3.2.15: TT#[redacted]-6024] [Sec. 2.6.6.B.3.5].
g　Six-Month Oral Toxicity Study in Rats (TT#[redacted]-6033) [資料4.2.3.2.16: TT#[redacted]-6033] [Sec. 2.6.6.B.3.6].
h　Fourteen-Day Oral Toxicity Study in Dogs (TT#[redacted]-6013) [資料4.2.3.2.17: TT#[redacted]-6013] [Sec. 2.6.6.B.3.7].
i　Three-Month Oral Toxicity Study in Dogs (TT#[redacted]-6025) [資料4.2.3.2.18: TT#[redacted]-6025]　[Sec. 2.6.6.B.3.8].
j　Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs (TT#[redacted]-6030) [資料4.2.3.2.19: TT#[redacted]-6030] [Sec. 2.6.6.B.3.9].
k　One-Month Oral Combination Toxicity Study in Dogs (TT#[redacted]-6051) [資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051] [Sec. 2.6.6.B.8.7.3].
l　Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rabbits (TT#[redacted]-7180) [資料4.2.3.5.2.17: TT#[redacted]-7180] [Sec. 2.6.6.B.6.2.4].
GD 15 = Gestation Day; SW = Study Week.

Confidential

2.6.7.B.3　　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表（続き）

Test Article:　Elbasvir

Steaty State AUC (µM•hr)



Confidential

2.6.7.B.4　　毒性試験：原薬

Test Article:　Elbasvir

Batch No.	**Purity (%)**[2]	**Specified Impurities (HPLC, area %)**[3] A[4]	B[5]	C[6]	D[7]	E[8]	F[9]	G[10]	H[11]	I[12]	**Study Number**	**Type of Study**
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-8730	Assay for Micronucleus Induction in Rat Bone Marrow from an Exploratory 4-Day Oral Biomarker and Gene Expression Study
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-2901	Exploratory 7-Day Tolerability Study in Male Rats
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-8239	Microbial Mutagenesis Assay
											TT#[redacted]-8688	Exploratory Assays for Micronucleus Induction In Vitro, in Chinese Hamster Ovary Cells
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-6014	Fourteen-Day Oral Toxicity Study in Rats with Micronucleus and Functional Observational Battery Assays

Confidential

2.6.7.B.4　毒性試験：原薬（続き）

Test Article: Elbasvir

Batch No.	**Purity (%)**[2]	**Specified Impurities (HPLC, area %)**[3] A[4]	B[5]	C[6]	D[7]	E[8]	F[9]	G[10]	H[11]	I[12]	**Study Number**	**Type of Study**
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted] (Cont.)											TT#[redacted]-6017	Fifteen-Day Oral Toxicokinetic Study in Rats
											TT#[redacted]-6013	Fourteen-Day Oral Toxicity Study in Dogs
											TT#[redacted]-8060	Microbial Mutagenesis Assay
											TT#[redacted]-8536	Assay For Chromosomal Aberrations In Vitro, in Chinese Hamster Ovary Cells
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-6024	Three-Month Oral Toxicity Study in Rats

Confidential

2.6.7.B.4　　毒性試験：原薬（続き）

Test Article:　Elbasvir

Batch No.	**Purity (%)**[2]	**Specified Impurities (HPLC, area %)**[3] A[4]	B[5]	C[6]	D[7]	E[8]	F[9]	G[10]	H[11]	I[12]	**Study Number**	**Type of Study**
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted] (Cont.)											TT#[redacted]-6025	Three-Month Oral Toxicity Study in Dogs
											TT#[redacted]-7175	Exploratory Oral Range-Finding Study in Pregnant Rats
											TT#[redacted]-7185	Exploratory Oral Range-Finding Study in Pregnant Rabbits
											TT#[redacted]-6030	Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-6033	Six-Month Oral Toxicity Study in Rats
											TT#[redacted]-6030	Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-6033	Six-Month Oral Toxicity Study in Rats

Confidential

2.6.7.B.4　　毒性試験：原薬（続き）

Test Article:　Elbasvir

Batch No.	**Purity (%)**[2]	**Specified Impurities (HPLC, area %)**[3] A[4]	B[5]	C[6]	D[7]	E[8]	F[9]	G[10]	H[11]	I[12]	**Study Number**	**Type of Study**
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted] (Cont.)											TT#[redacted]-6030	Nine-Month Oral Toxicity Study in Dogs
											TT#[redacted]-6047	One-Month Oral Range-Finding and Toxicokinetic Study in rasH2 Wild-Type Mice
											TT#[redacted]-7290	Oral Fertility Study in Female and Male Rats
											TT#[redacted]-7170	Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats
											TT#[redacted]-7180	Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rabbits

Confidential

2.6.7.B.4　　毒性試験：原薬（続き）

Test Article:　Elbasvir

Batch No.	**Purity (%)**[2]	**Specified Impurities (HPLC, area %)**[3] A[4]	B[5]	C[6]	D[7]	E[8]	F[9]	G[10]	H[11]	I[12]	**Study Number**	**Type of Study**
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted] (Cont.)											TT#[redacted]-7020	Oral Pre- and Postnatal Developmental Toxicity Study in Rats
											TT#[redacted]-9042	Three Day Oral (Gavage) Phototoxicity and Bioanalysis Evaluation of MK-8742 in Male Pigmented Rats
											TT#[redacted]-7800	In Vitro Hemolysis Assay of MK-8742 Formulation
											TT#[redacted]-1031	One-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a Three-Month Treatment-Free Period
											TT#[redacted]-6051	One-Month Oral Combination Toxicity study in Dogs

Confidential

2.6.7.B.4　毒性試験：原薬（続き）

Test Article: Elbasvir

Batch No.	**Purity (%)**[2]	**Specified Impurities (HPLC, area %)**[3] A[4]	B[5]	C[6]	D[7]	E[8]	F[9]	G[10]	H[11]	I[12]	**Study Number**	**Type of Study**
PROPOSED SPECIFICATION[1]:	[redacted]- [redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT#[redacted]-7807	Bovine Corneal Opacity and Permeability Test (BCOP)
											TT#[redacted]-7806	MatTek EpiDerm™ MTT Vialibility Assay
											TT#[redacted]-7805	Local Lymph Node Assay in Mice (LLNA)

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.4　　毒性試験：原薬（続き）

Test Article:　Elbasvir

1 See [Sec. 3.2.S.4.1] for complete specification.
2 Purity:　HPLC weight percent (anhydrous, solvent free basis).
3 Specified impurities:　HPLC area percent.
4 [redacted]
5 [redacted]
6 [redacted]
7 [redacted]
8 [redacted]
9 [redacted]
10 [redacted]
11 Individual, Unspecified impurity.　For lots with multiple unspecified impurities, this value represents the worst case (*i.e.*, the unspecified impurity present at the highest level).
12 Total Impurities.
ND = None detected (< [redacted] %).
NQ = Non-quantifiable ([redacted] % ≤NQ < [redacted] %).
* Early chemistry batch.　Purity [redacted] %.　Impurity profile not characterized.

Confidential

2.6.7.B.5　単回投与毒性試験

Test Article:　Elbasvir

No formal acute toxicity studies have been conducted. However, acute toxicity after a single dose can be assessed from the repeat-dose oral toxicity studies, where oral doses of elbasvir up to 1000 mg/kg in mice, 1000 mg/kg b.i.d. in rats, and 1000 mg/kg in dogs were administered. There was no evidence of acute toxicity in these species.

Confidential

2.6.7.B.6　反復投与毒性試験：非ピボタル試験

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL[a] (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ Jic:CB6F1-nonTgrasH2 @jcl	Oral gavage (10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water)	1 month	0, 10, 50, 300, 1000	Toxicity arm: 10 mice/sex/ group Toxicokinetic arm: 11 mice/sex/ elbasvirtreated group 5 control mice/sex	≥1000	**1000 mg/kg/day**: No test article-related findings *Elbasvir (F/M)* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 120/182 C_{max} (μM): 9.62/11.0 T_{max} (hr): 2.0/4.0 Liver (μM): 40.9/77.3, 43.2/49.9, 3.36/38.5 at 4-, 8-, and 24-hour postdose, respectively. **300 mg/kg/day**: No test article-related findings *Elbasvir (F/M)* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 68.3/76.0 C_{max} (μM): 6.76/7.36 T_{max} (hr): 2.0/4.0 Liver (μM): 28.7/51.4, 24.3/30.5, 0.776/1.08 at 4-, 8-, and 24-hour postdose, respectively.	TT#[redacted]-6047 [資料 4.2.3.2.11: TT#[redacted]-6047]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.6　反復投与毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL[a] (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ Jic:CB6F1-nonTgrasH2 @jcl	Oral gavage (10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water)	1 month	0, 10, 50, 300, 1000	Toxicity arm: 10 mice/sex/ group Toxicokinetic arm: 11 mice/sex/ elbasvir-treated group 5 control mice/sex	≥1000	**50 mg/kg/day**:　No test article-related findings *Elbasvir (F/M)* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 13.6/21.1 C_{max} (μM):　3.23/3.59 T_{max} (hr):　1.0/2.0 Liver (μM): 6.35/11.8, 2.43/5.99, <LLQ/<LLQ at 4-, 8-, and 24-hour postdose, respectively. **10 mg/kg/day**:　No test article-related findings *Elbasvir (F/M)* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr): 2.33/3.47 C_{max} (μM):　0.442/0.588 T_{max} (hr):　1.0/1.0 Liver (μM): 2.05/2.70, 0.392/1.62, <LLQ/<LLQ at 4-, 8-, and 24-hour postdose, respectively.	TT#[redacted]-6047 [資料 4.2.3.2.11: TT#[redacted]-6047] (Continued)

a　No-Observed-Adverse-Effect Level.
b　Assuming a liver density of 1.0
F = Female; LLQ = Lower Limit of Quantitation; M = Male.

Confidential

2.6.7.B.6　反復投与毒性試験：非ピボタル試験（続き）

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL[a] (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage (10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water)	7 days	0, 10, 100, 750	5M/Group	≥750	**750 mg/kg/day**:　No test article-related findings *Elbasvir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr):　15.9 C_{max} (μM):　1.14 T_{max} (hr):　4.75 **100 mg/kg/day**:　No test article-related findings *Elbasvir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr):　6.71 C_{max} (μM):　0.944 T_{max} (hr):　3.20 **10 mg/kg/day**:　No test article-related findings *Elbasvir* $AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr):　0.280 C_{max} (μM):　0.0415 T_{max} (hr):　3.60	TT#[redacted]-2901 [資料 4.2.3.2.12: TT#[redacted]-2901]

a　No-Observed-Adverse-Effect Level.
M = Male.

Confidential

2.6.7.B.7A　反復投与毒性試験：ラットの14日間経口投与毒性試験（小核試験、機能観察総合評価）

Test Article: Elbasvir

Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han) **Initial Age:** ~8 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 5 mL/kg at each dosing session	**Duration of Dosing:** 14 days or 15 days **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation:** 10% (w/w) (low- and mid-dose groups)[a] or 5% (w/w) (high-dose group) polysorbate 80 in deionized water/Suspension	**Study Number:** TT#[redacted]-6014 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014] **GLP Compliance:** Yes
Special Features: Evaluation of elbasvir liver concentrations, Micronucleus and Funtional Observational Battery Assays **No-Observed-Adverse-Effect Level:** ≥1000 mg/kg b.i.d.		

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d.[b] (Control)		100		300		1000 b.i.d.[b]	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetics[c] – Study Week 2								
$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	N/A[d]	N/A[d]	7.84	14.3	15.5	27.0
C_{max} (µM)	N/A	N/A	N/A[d]	N/A[d]	0.862	1.28	1.07	1.96
T_{max} (hr)	N/A	N/A	N/A[d]	N/A[d]	4.0	6.0	8.0	8.0
Liver Concentrations [e,f] (µM) - Final Necropsy	N/A	N/A	1.74	1.92	2.74	2.91	6.35	11.0

Confidential

2.6.7.B.7A　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6014 [資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d.[b] (Control)		100		300		1000 b.i.d.[b]	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[g]	180.6g	296.6g	-0.72	1.2	1.22	-3.64	-9.8	-5.9
Body Weight Change (g)[h] **(Pretest – Study Week 1)**	+6.6	+15	+5.0	+17	+7.6	+13	[+1.9]	[+7]
Body Weight Change (g)[h] **(Pretest - Study Week 2)**	+17	+42	+16	+43	+20	[+36]	[+14]	[+32]
Food Consumption (g)[h] **- Study Week 1**	15.9	23.5	15.1	24.0	15.0	21.5	[12.2]	[20.6]
Clinical Observations								
White discoloration of feces	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[10/10]	[10/10]
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Functional Observational Battery	-	-	-	-	-	-	-	-
Micronucleus Assay	-	-	-	-	-	-	-	-

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.7A　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6014 [資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 b.i.d.[b] (Control)		100		300		1000 b.i.d.[b]	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings (Continued)								
Hematology[h]- Study Week 2								
Neutrophils 10[3]/uL	0.48	0.68	0.45	0.70	0.53	[1.16]*	[0.77]	0.85
Serum Biochemistry[h] – Study Week 2								
Cholesterol (mg/dL)	45	50	45	55	54	53	54	[68]*
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology (Incidence)	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology (Incidence)	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-

a　Due to an error in the vehicle preparation instructions, the concentration was approximately 9.8% throughout the study instead of 10%.　This had no impact on the quality and integrity of the study.
b　Approx. 6 hour-interval between the 2 daily dosing sessions.
c　Elbasvir concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (0.023 µM) at all time points.
d　Due to a sample preparation problem, samples from the 100-mg/kg/day dose group could not be analyzed and data were generated in study TT#[redacted]-6017 [資料4.2.3.2.14: TT#[redacted]-6017] [Sec. 2.6.6.B.3.4].
e　Assuming a liver density of 1.
f　Elbasvir liver concentrations from all control animals were below the lower limit of quantitation (0.246 µM).
g　At end of dosing period.　For controls, group means are shown.　For dose groups, percent differences from controls are shown.
h　Control and treatment group values are mean absolute values.
- = No noteworthy findings.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
#/# = number affected/number examined.
*　$p \leq 0.05$.
b.i.d. = Bis in die; F = Female; M = Male; N/A = Not applicable; NE = Not examined.

Confidential

2.6.7.B.7B　反復投与毒性試験：ラットの15日間経口投与トキシコキネティクス試験

Test Article: Elbasvir

Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han) **Initial Age:** ~ 8 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 5 mL/kg	**Duration of Dosing:** 15 days **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation:** 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water/Suspension	**Study Number:** TT#[redacted]-6017 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.14: TT#[redacted]-6017] **GLP Compliance:** Yes
Special Features: None **No-Observed-Adverse-Effect Level:** Not applicable		

Daily Dose (mg/kg)	100	
Number of Animals	F:5	M:5
Toxicokinetics – Study Week 3		
$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)	4.91	8.85
C_{max} (µM)	0.598	0.751
T_{max} (hr)	1.8	4.0

Confidential

2.6.7.B.7C　反復投与毒性試験：ラットの3ヵ月間経口投与毒性試験

Test Article: Elbasvir

Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han) **Initial Age:** 5 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 5 mL/kg	**Duration of Dosing:** 3 months **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation:** 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water/Suspension	**Study Number:** TT#[redacted]-6024 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.15: TT#[redacted]-6024] **GLP Compliance:** Yes
Special Features: Evaluation of elbasvir liver concentrations **No-Observed-Adverse-Effect Level:** ≥1000 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		50		300		1000	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetics[a] – Study Week 13								
$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	2.75	5.96	8.64	11.5	15.1	19.5
C_{max} (µM)	N/A	N/A	0.416	0.584	0.965	0.916	1.10	1.37
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.0	2.0	4.0	4.0	4.0	8.0
Liver Concentrations[b,c] – Final Necropsy (µM)[b]	N/A	N/A	1.15	1.31	4.00	5.69	6.05	7.71

Confidential

2.6.7.B.7C　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6024 [資料4.2.3.2.15: TT#[redacted]-6024] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		50		300		1000	
Number of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[d]	231.3 g	458.9 g	3.1	-4.6	1.6	-6.1	0.6	-7.5
Clinical Observations								
Salivation (transient, postdose)	0/10	0/10	0/10	[3/10]	[6/10]	[4/10]	[9/10]	[10/10]
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-

Footnotes on following page.

Confidential

a　Elbasvir concentrations in plasma from all control group animals at 4 hours posttdose were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 µM).
b　Assuming a liver density of 1.
c　Elbasvir liver concentrations from all control animals were below the lower limit of quantitation (0.226 µM).
d　At end of dosing period.　For controls, group means are shown.　For dose groups, percent differences from controls are shown.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
#/# = number affected/number examined.
F = Female; M = Male; N/A = Not applicable; NE = Not examined.

Confidential

2.6.7.B.7D　反復投与毒性試験：ラットの6ヵ月間経口投与毒性試験

Test Article: Elbasvir

Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han) **Initial Age:** 5 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 5 mL/kg	**Duration of Dosing:** 6 months **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation:** 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water/Suspension	**Study Number:** TT#[redacted]-6033 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.16: TT#[redacted]-6033] **GLP Compliance:** Yes
Special Features: Evaluation of elbasvir liver concentrations **No-Observed-Adverse-Effect Level:** ≥1000 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		30		300		1000	
Number of Animals	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15
Toxicokinetics[a] – Study Week 13								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	2.98	4.30	14.6	15.6	19.8	24.1
C_{max} (µM)	N/A	N/A	0.392	0.498	1.12	1.20	1.33	1.76
T_{max} (hr)	N/A	N/A	1.0	2.0	2.0	4.0	8.0	8.0
Liver Concentrations [b,c] – Final Necropsy (µM)	N/A	N/A	0.430	0.942	2.03	6.83	6.34	12.6

Confidential

2.6.7.B.7D　反復投与毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-6033 [資料4.2.3.2.16: TT#[redacted]-6033] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		30		300		1000	
Number of Animals	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	-	1/15[d]	-	-	-	-	-	1/15[d]
Body Weight (%)[e]	255.7 g	525.8 g	2.3	-6.3	3.4	-9.2	1.4	-13.3
Body Weight Change (g)[f] **-Pretest to Study Week 26**	+96.2	+209.5	+96.5	+201.6	+99.9	[+197.1]	+94.7	[+186.0]
Food Consumption	-	-	-	-	-	[D]	-	[D]
Clinical Observations								
Salivation (transient, postdose)	0/15	0/15	[9/15]	[15/15]	[15/15]	[15/15]	[15/15]	[15/15]
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis								
Urine Volume			[I]	[I]	[I]	[I]	[I]	[I]
Specific Gravity			[D]	[D]	[D]	[D]	[D]	[D]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.7D　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6033 [資料4.2.3.2.16: TT#[redacted]-6033] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		30		300		1000	
Number of Animals	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15
Noteworthy Findings (Continued)								
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-

a　Elbasvir concentrations in plasma from all control group animals at 4 hours posttdose were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 µM).
b　Assuming a liver density of 1.
c　Elbasvir liver concentrations from all control animals were below the lower limit of quantitation (0.229 µM).
d　Control male #12-0022 and high-dose male #12-0106 were found dead on Study Day 79 following blood collection for clinical pathology examinations and following dosing, respectively.　There were no relevant clinical signs prior to death.　These unscheduled deaths were considered accidental.
e　At end of dosing period.　For controls, group means are shown.　For dose groups, percent differences from controls are shown.
f　Control and treatment group values are mean absolute values.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
#/# = number affected/number examined.
D = Decrease; F = Female; I = Increase; M = Male; N/A = Not applicable; NE = Not examined.

Confidential

2.6.7.B.7E　反復投与毒性試験：イヌの14日間経口投与毒性試験

Test Article: Elbasvir

Species/Strain: Dog/beagle **Initial Age:** 44 to 54 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 5 mL/kg	**Duration of Dosing:** 14 days **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation:** 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water[a]/Suspension	**Study Number:** TT#[redacted]-6013 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.17: TT#[redacted]-6013] **GLP Compliance:** Yes
Special Features: Evaluation of elbasvir liver concentrations **No-Observed-Adverse-Effect Level:** ≥1000 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	25	
Number of Animals	F:2	M:2
Toxicokinetics – Study Day 1		
$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)	15.2	7.05
C_{max} (µM)	1.24	0.594
T_{max} (hr)	2.0	3.0
Toxicokinetics – Study Week 2		
$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)	21.1	10.9
C_{max} (µM)	1.95	0.946
T_{max} (hr)	3.0	4.0
Liver Concentrations (µM)[b] – Final Necropsy	4.46	4.13

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.7E　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6013 [資料4.2.3.2.17: TT#[redacted]-6013] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	25	
Number of Animals	F:2	M:2
Noteworthy Findings		
Mortality (No. of Animals)	-	-
Body Weight (kg)[c]	9.6	10.5
Food Consumption	-	-
Clinical Observations	-	-
Electrocardiography	-	-
Hematology	-	-
Serum Biochemistry	-	-
Urinalysis/Urine Chemistry	-	-
Organ Weights (%)	-	-
Gross Pathology	-	-
Histomorphology	-	-

a　Due to an error in the vehicle preparation instructions, the concentration was approximately 9.8% throughout the study instead of 10%.　This had no impact on the quality and integrity of the study.
b　Assuming a liver density of 1.
c　Study Day 14 group mean absolute are presented.
- = No noteworthy findings.
F = Female; M = Male; N/A = Not applicable.

Confidential

2.6.7.B.7F　反復投与毒性試験：イヌの3ヵ月間経口投与毒性試験

Test Article: Elbasvir

Species/Strain: Dog/beagle **Initial Age:** 29 to 38 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 5 mL/kg	**Duration of Dosing:** 3 months **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation:** 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water/Suspension	**Study Number:** TT#[redacted]-6025 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.18: TT#[redacted]-6025] **GLP Compliance:** Yes[a]
Special Features: Evaluation of elbasvir liver concentrations **No-Observed-Adverse-Effect Level:** ≥1000 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		2		25		1000	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Toxicokinetics[b] – Study Day1								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	0.182	0.183[c]	6.70	5.45	34.7	18.6
C_{max} (µM)	N/A	N/A	0.0465	0.570[c]	0.908	0.566	1.82	1.37
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.0	2.0[c]	9.3	2.3	24	11
Toxicokinetics[b] – Study Week 5								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	0.160	0.204	6.04	5.88	22.3	17.6
C_{max} (µM)	N/A	N/A	0.0366	0.0490	0.949	0.494	1.98	1.50
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.0	2.0	2.0	2.3	4.0	10

Confidential

2.6.7.B.7F　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6025 [資料 4.2.3.2.18: TT#[redacted]-6025] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		2		25		1000	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Toxicokinetics[b] – Study Week 13								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	ID	0.133	5.48	5.07	18.9	19.7
C_{max} (µM)	N/A	N/A	ID	0.0341	0.712	0.345	1.36	0.959
T_{max} (hr)	N/A	N/A	ID	1.3	2.3	1.7	4.0	11
Liver Concentrations (µM)[d,e] – Final Necropsy	N/A	N/A	0	0	4.57	16.7	14.5	24.7

Confidential

2.6.7.B.7F　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6025 [資料4.2.3.2.18: TT#[redacted]-6025] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		2		25		1000	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[f]	8.5 kg	10.5 kg	-3.5	-9.5	0	-7.6	-7.1	-11.4
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations								
White/pale brown discoloration of feces	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	2/3	[3/3]	[3/3]
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.B.7F　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6025 [資料4.2.3.2.18: TT#[redacted]-6025] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		2		25		1000	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Noteworthy Findings (Continued)								
Mortality (No. of Animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology (Incidence)	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology (Incidence)								
Peyers patches								
Vacuolation	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	[1/3]	[3/3]	[3/3]
Large intestine								
Lymphoid tissue, vacuolation	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	[1/3]	[2/3]	[3/3]
Lymph nodes								
Vacuolation	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	[1/3]	[3/3]	[3/3]
Spleen								
Lymphoid tissue, vacuolation	0/3	0/3	NE	NE	0/3	0/3	[1/3]	[3/3]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.7F　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6025 [資料4.2.3.2.18: TT#[redacted]-6025] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		2		25		1000	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Noteworthy Findings (Continued)								
Additional Examinations: Exploratory Transmission Electron Microscopyg								
Lymph nodes Increased number and size of lysosomes containing myelin figures, consistent with phospholipidosis	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[2/2]

a　Except for transmission electron microscopy examinations which were non-GLP.
b　Elbasvir concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 µM).
c　Results from 1 male only, others had less than 3 consecutive concentrations above LLQ.
d　Assuming a liver density of 1.
e　Elbasvir liver concentrations from all control animals were below the lower limit of quantitation (0.226 µM).
f　At end of dosing period.　For controls, group means are shown.　For dose groups, percent differences from controls are shown.
g　On 2 high-dose males dogs.
- = No noteworthy findings.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
#/# = number affected/number examined.
F = Female; ID = Insufficient data; M = Male; N/A = Not applicable; NE = Not examined.

Confidential

2.6.7.B.7G　反復投与毒性試験：イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験

Test Article: Elbasvir

Species/Strain: Dog/beagle **Initial Age:** 26 to 30 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 5 mL/kg	**Duration of Dosing:** Approximately 9 months **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation:** 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water/Suspension	**Study Number:** TT#[redacted]-6030 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.2.19: TT#[redacted]-6030] **GLP Compliance:** Yes
Special Features: Evaluation of elbasvir liver concentrations **No-Observed-Adverse-Effect Level:** ≥1000 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		25		1000	
Number of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Toxicokinetics[a] – Study Day1								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	0.972	0.885	5.78	3.91	31.6	23.6
C_{max} (µM)	N/A	N/A	0.137	0.103	0.741	0.333	2.08	1.41
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.5	2.5	2.8	3.0	20	15
Toxicokinetics[a] – Study Week 4								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	0.950	0.872	4.20	4.39	17.8	20.1
C_{max} (µM)	N/A	N/A	0.175	0.0999	0.543	0.423	1.52	1.38
T_{max} (hr)	N/A	N/A	2.3	2.3	1.5	1.5	2.8	14

Confidential

2.6.7.B.7G　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6030 [資料4.2.3.2.19: TT#[redacted]-6030] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		25		1000	
Number of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Toxicokinetics[a] – Study Week 13								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	0.752	0.665	3.56	4.75	22.5	15.8
C_{max} (µM)	N/A	N/A	0.114	0.0867	0.474	0.384	1.74	1.65
T_{max} (hr)	N/A	N/A	1.8	3.0	1.5	2.3	9.0	2.6
Toxicokinetics[a] – Study Week 26								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A	N/A	0.879	0.905	4.45	3.78	17.6	15.6
C_{max} (µM)	N/A	N/A	0.0796	0.0844	0.638	0.311	1.50	1.11
T_{max} (hr)	N/A	N/A	1.0	2.1	1.5	2.0	8.5	7.8
Liver Concentrations (µM)[b,c] – Final Necropsy	N/A	N/A	1.76	0.507	1.78	2.09	9.62	18.4

Confidential

2.6.7.B.7G　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6030 [資料4.2.3.2.19: TT#[redacted]-6030] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		25		1000	
Number of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[d]	8.6 g	10.1 g	4.7	-6.9	0.0	5.0	-8.1	-1.0
Body Weight Change (kg)[e]								
Pretest to Study Week 4	+0.2	+0.3	+0.4	-0.1	+0.2	+0.4	[-0.3][f]	[-0.2][g]
Pretest to Study Week 38	+1.7	+1.9	+1.7	+1.2	+1.6	+2.1	[+0.9][h]	+1.4
Food Consumption								
Unsatisfactory, more than 2/3 remaining	1/4	0/4	1/4	0/4	3/4	0/4	[4/4][i]	[3/4][i]
Clinical Observations								
Emesis (sporadic)								
Liquid	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[4/4]	[4/4]
Food	1/4	3/4	2/4	1/4	2/4	2/4	[3/4]	[3/4]
Foamy	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-	[1/4]
Discoloration of feces (frequent, mainly white or pale brown)[j]	1/4	0/4	1/4	0/4	3/4	1/4	[4/4]	[4/4]
Presence of substance in pan (occasional, mainly white or pale brown)[j]	2/4	2/4	1/4	1/4	1/4	0/4	[4/4]	[4/4]

Confidential

2.6.7.B.7G　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6030 [資料4.2.3.2.19: TT#[redacted]-6030] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		25		1000	
Number of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings (Continued)								
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology (Incidence)	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology (Incidence)								
Stomach								
Lymphoid Tissue, Vacuolation	0/4	0/4	NE	NE	0/4	0/4	[2/4]	[1/4]
Peyer's Patches								
Vacuolation	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	0/4	[4/4]	[3/4]
Large Intestine								
Lymphoid Tissue, Vacuolation	0/4	0/4	NE	NE	0/4	0/4	[4/4]	[1/4]

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.7G　反復投与毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6030 [資料4.2.3.2.19: TT#[redacted]-6030] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		25		1000	
Number of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings (Continued)								
Gallbladder								
Lymphoid Tissue, Vacuolation	0/4	0/4	NE	NE	0/4	0/4	[1/4]	0/4
Lymph Node								
Vacuolation	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	[4/4]	[4/4]

a　Elbasvir concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.023 µM) of the bioanalytical method.
b　Assuming a liver density of 1.
c　Elbasvir concentrations in plasma from all control group animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.229 µM) of the bioanalytical method.
d　At end of dosing period.　For controls, group means are shown.　For dose groups, percent differences from controls are shown.
e　Control and test article group values are mean absolute values.
f　Mainly due to 1 female.
g　Mainly due to 1 male.
h　Mainly due to one female.　In addition, intermittent body weight losses were noted in 2 females in Study Wekks 4/5 and 7/8.
i　Occasional unsatisfactory food consumption in all females and in 1 male #12-0026 mainly up to Study Week 17.
j　Most likely due to presence of test article in feces.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
#/# = number affected/number examined.
- = No noteworthy findings.
F = Female; M = Male; N/A = Not applicable; NE = Not examined.

Confidential

2.6.7.B.8　遺伝毒性試験 – In Vitro：非ピボタル試験

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	**Method of Adminis-tration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Chinese Hamster Ovary cells	In vitro (DMSO/ Solution)	3 hours (+ S-9) 3 hours (-S-9) 20 hours (-S-9)	0.25, 0.5 (20 hours –S-9 only), **1.0, 2.5, 5.0,** 7.5, 10; Bolded concentrations were scored for aberrations	N/A	Negative.　The highest concentration scored was limited by solubility.	TT#[redacted]-8688 [資料4.2.3.3.1.5: TT#[redacted]-8688]

DMSO = dimethyl sulfoxide.
N/A　= Not applicable.

Confidential

2.6.7.B.8A　遺伝毒性試験 – In Vitro：細菌を用いる復帰突然変異試験

Test Article:　Elbasvir

Test for Induction of: Reverse mutation to wild type in bacteria cells **Strains:** *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537 or TA97a, TA98, and TA100), *Escherichia coli* (WP2 uvrA or WP2 uvrA pKM101) **Metabolizing System:** Xenobiotic-induced rat liver S-9; 50 µL/plate **Treatment:** Approximately 48 to 72 hours	**No. of Independent Assays:** 2 **No. of Replicate Cultures:** 3 per dose point **No. of Cells Analyzed/Culture:** Not applicable **Vehicle for Positive Controls:** Solutions in DMSO or water depending on compound **Vehicle for Test Article**: DMSO	**Study No.**: TT#[redacted]-8239; TT#[redacted]-8060 **Location in CTD:** Section [資料4.2.3.3.1.3: TT#[redacted]-8239] **GLP Compliance**: Yes, except for TT#[redacted]-8239 **Date of Treatment:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] for TT#[redacted]-8239 [redacted]-[redacted]-20[redacted] for TT#[redacted]-8060
Cytotoxic Effects: Some toxicity was apparent as suppression of revertant growth at the top doses in some of the test strains. **Genotoxic Effects†:** None		

† Criteria for a positive result are (1) a 2-fold or greater increase in number of revertant colonies, and (2) a dose-related increase in number of revertant colonies.

Confidential

2.6.7.B.8A　遺伝毒性試験：In Vitro　**Study No.:** TT#[redacted]-8239 and TT#[redacted]-8060 [資料4.2.3.3.1.3: TT#[redacted]-8239] (Continued)

TT#[redacted]-8239	TA100				TA1535				TA1537			
Conc. µg/Plate	Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
DMSO 100 µL	123	18	125	5	15	5	15	5	18	2	18	1
50 µg	122	10	153	17	18	5	16	4	11	4	15	6
158 µg	137	6	147	10	14	4	25	5	13	6	19	1
500 µg	134	8	146	10	15	5	21	3	12	5	15	2
1581 µg	120*	21	148*	5	10*	4	17*	4	13*	5	16*	2
5000 µg	106*	22	132*	16	13*	2	16*	4	11*	3	15*	3
2AA 5.0 µg							475	15				
Benzo[a]Pyrene 5 µg			1214	39							92	13
9-Aminoacridine 50 µg									482	63		
Sodium Azide 0.5 µg	387	50			272	12						

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.8A　遺伝毒性試験：In Vitro　**Study No.:**　TT#[redacted]-8239 and TT#[redacted]-8060 [資料4.2.3.3.1.3: TT#[redacted]-8239] (Continued)

TT#[redacted]-8239	TA98				WP2 uvrA			
Conc. µg/Plate	Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
DMSO 100 µL	36	5	43	6	44	10	58	6
50 µg	33	5	39	1	49	1	60	3
158 µg	32	5	38	10	44	2	60	17
500 µg	25	6	46	4	48	1	58	5
1581 µg	28*	6	38*	6	40*	11	43*	3
5000 µg	28*	6	38*	5	34*	10	48*	6
2AA 15 µg							244	4
Benzo[a]Pyrene 5 µg			387	36				
2-Nitrofluorene 1 µg	130	8						
4-Nitroquinoline 0.5 µg					153	17		

Salmonella typhimurium/E. coli genotypes:

TA100 his G46 (base substitution) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).
TA1535 his G46 (base substitution) ΔuvrB rfa.
TA1537 hisC3076 (frameshift) ΔuvrB rfa.
TA98 his D3052 (frameshift) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).
WP2 uvrA (trp-) ΔuvrA.

S-9 =　Metabolic activation.
SD =　Standard deviation.
*　=　Precipitate; did not interfere with scoring.
DMSO = Dimethyl sulfoxide.
2AA　= 2-Aminoanthracene.

Confidential

2.6.7.B.8A　遺伝毒性試験 – In Vitro　**Study No.:**　TT#[redacted]-8239 and TT#[redacted]-8060 [資料4.2.3.3.1.3: TT#[redacted]-8239] (Continued)

TT#[redacted]-8060	TA100 [redacted]3-[redacted]-20[redacted]				TA1535 [redacted]-[redacted]-20[redacted]				TA97a [redacted]-[redacted]-20[redacted]			
Conc. µg/Plate	Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0 µg	114.9	14.7	111.4	17.9	19.5	6.1	20.7	7.3	124.2	18.9	168.4	12.7
100 µg	108.3	12.5	119.7	22.1	25.7	11.2	22.3	3.5	125.0	22.6	154.0	23.9
300 µg	102.3	24.5	109.0	11.5	20.7	7.1	23.3	9.3	130.7	18.9	159.0	5.3
1000 µg	99.0*	20.3	104.0*	13.0	12.7*	4.0	18.0*	10.1	105.7*	28.0	149.7*	15.3
3000 µg	84.3*	5.1	94.0*	24.4	14.3*	5.1	13.3*	4.0	106.3*	9.0	123.3*	11.0
5000 µg	88.0*	2.0	101.0*	10.6	12.3*	2.1	15.3*	1.5	99.3*	20.7	127.7*	10.2

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.8A　遺伝毒性試験 – In Vitro　**Study No.:** TT#[redacted]-8239 and TT#[redacted]-8060 [資料4.2.3.3.1.3: TT#[redacted]-8239] (Continued)

TT#[redacted]-8060	TA98[redacted]-[redacted]-20[redacted]				WP2 uvrA pKM101[redacted]-[redacted]-20[redacted]			
Conc. µg/Plate	Without S-9		With S-9		Without S-9		With S-9	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0 µg	43.2	9.3	44.8	8.5	158.2	18.6	162.3	17.2
100 µg	53.3	10.1	46.3	4.5	157.3	30.1	155.0	4.0
300 µg	43.0	6.1	49.3	4.6	171.7	3.5	162.0	27.7
1000 µg	39.3*	2.3	40.0*	6.6	139.3*	22.3	162.7*	9.1
3000 µg	31.3*	2.1	36.3*	4.9	105.0*	15.1	130.3*	5.8
5000 µg	27.3*	4.5	33.7*	4.9	109.3*	15.1	125.0*	9.5

Salmonella typhimurium/E. coli genotypes:
TA100 his G46 (base substitution) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).
TA1535 his G46 (base substitution) ΔuvrB rfa.
TA97a his D6610 (frameshift) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).
TA98 his D3052 (frameshift) ΔuvrB rfa pKM101 (R factor).

S-9 =　Metabolic activation.
SD =　Standard deviation.
* =　Precipitate; did not interfere with scoring
WP2 uvrA pKM101 (trp-) ΔuvrA pKM101 (R factor).

Confidential

2.6.7.B.8A　遺伝毒性試験 – In Vitro　**Study No.:** TT#[redacted]-8239 and TT#[redacted]-8060 [資料4.2.3.3.1.3: TT#[redacted]-8239] (Continued)

TT#[redacted]-8060			*Salmonella typhimurium* Strains								*Escherichia coli* Strain	
Mutagen[a]	S-9 +/-	Conc. µg/ Plate	TA1535 Fold Inc		TA97a Fold Inc		TA98 Fold Inc		TA100 Fold Inc		WP2 ΔuvrA pKM101 Fold Inc	
Sodium azide	-	0.75 µg	26.6		1.1		1.2		4.3		1.0	
ICR-191	-	1.5 µg	1.1		6.1		1.3		1.2		1.0	
2-Nitrofluorene	-	1.0 µg	1.4		1.7		5.4		2.7		1.0	
4NQO	-	1.0 µg	3.4		5.8		13.9		20.2		6.6	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
DMSO	-	100 µL	19.5	6.1	124.2	18.9	43.2	9.3	114.9	14.7	158.2	18.6
2AA	-	1.0 µg	25.3	10.1	114.7	18.5	49.7	8.4	123.3	15.9		
2AA	-	2.0 µg	21.0	2.6	138.7	23.5	57.3	8.7	112.0	20.5	166.7	25.0
2AA	-	5.0 µg									166.0	23.8
DMSO	+	100 µL	20.7	7.3	168.4	12.7	44.8	8.5	111.4	17.9	162.3	17.2
2AA	+	1.0 µg	72.3	11.0	378.7	4.5	286.0	17.6	585.3	7.6		
2AA	+	2.0 µg	155.0	14.4	814.3	67.8	742.7	27.6	1158.0	59.3	308.7	20.5
2AA	+	5.0 µg									683.0	61.0
Distilled Water	-	100 µL	16.3	3.5	134.0	20.1	48.0	2.0	125.3	18.9	163.0	3.5

a　Sodium azide was dissolved in water; all other compounds, in DMSO.
S-9 = Metabolic activation.
2AA = 2-Aminoanthracene.
4NQO = 4-Nitroquinoline oxide.
DMSO = Dimethyl sulfoxide; SD = Standard Deviation.

Confidential

2.6.7.B.8B　遺伝毒性試験 – In Vitro：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いる染色体異常試験

Test Article:　Elbasvir

Test for Induction of:　Chromosome Aberrations **Strains:**　Chinese Hamster Ovary cells, clone WBL **Metabolizing System:**　Beta-naphthoflavone and phenobarbital-induced rat liver S9, 1.5% **Vehicle for Test Article:**　Dimethylsulfoxide (DMSO) **Treatment:**　Continuous treatment for 20 hours without S9; pulse treatment 3 hours with and without S9. Harvested 20 hours after beginning of treatment.	**No. of Independent Assays**:　1 **No. of Replicate Cultures:**　1 **No. of Cells Analyzed/Culture:**　200 except high-dose positive controls **Vehicle for Positive Controls:**　Distilled water **Vehicle for Test Article**:　DMSO	**Study No.:**　TT#[redacted]-8536 **Location in CTD:**　Section [資料4.2.3.3.1.4: TT#[redacted]-8536] **GLP Compliance:**　Yes **Date of Treatment**:　[redacted]-[redacted]-20[redacted]
Cytotoxic Effects:　See tables below. **Genotoxic Effects:**　None†.		
† A test is considered positive if there are statistically significant increases ($p \leq 0.05$) over concurrent controls in the percentages of aberrant cells at 2 or more separate concentrations of test article without greatly exceeding a 50% reduction in growth.　The analysis is a pairwise comparison of the percentage of cells with aberrations at each dose level with the controls by Fisher's Exact test with the p-values adjusted for multiple comparisons against a common control by the method of Dunnett.　The tests with and without S-9 activation, and different treatment lengths are considered separately.		
Additional Comments Regarding Test:　The levels of endoreduplication (a particular morphological form of polyploidy) and polyploidy combined were similar to concurrent controls and within our historical control range of 0 to 9% polyploid cells.		

Confidential

2.6.7.B.8B　遺伝毒性試験 – In Vitro　**Study No.:**　TT#[redacted]-8536 [資料4.2.3.3.1.4: TT#[redacted]-8536] (Continued)

TT#[redacted]-8536:　Assay for Chromosomal Aberrations
Summary of Cytotoxicity and Aberrations at 20 Hours

Treatment	Cell Growth (PD, % Control)	Percent Aberrant Cells	Frequency Abs per 100 Cells[a]	Percent Endo-reduplicated (Polyploid) Cells[b]
With S-9 (3 hours)				
DMSO 1%	100	1.00	1.00	0.0 (1.0)
DMSO 1%	100	0.50	0.50	0.0 (1.6)
CP (5 µM)[c]	62	16.00**	16.00	NS
CP (10 µM)[d]	0	88.00**	160.00	NS
Elbasvir (µM)				
1.5	104	NS	N/A	N/A
5.0	109	NS	N/A	N/A
10	99	1.00	1.00	0.0 (0.8)
15	104	NS	N/A	N/A
20	98	1.00	1.00	0.0 (0.8)
25[e]	109	NS	N/A	N/A
30[f]	98	2.50	3.50	0.0 (1.2)
35[f]	Discarded	N/A	N/A	N/A
40[f]	Discarded	N/A	N/A	N/A

Confidential

2.6.7.B.8B　遺伝毒性試験 – In Vitro　**Study No.:**　TT#[redacted]-8536 [資料4.2.3.3.1.4: TT#[redacted]-8536] (Continued)

TT#[redacted]-8536:　Assay for Chromosomal Aberrations (Continued)
Summary of Cytotoxicity and Aberrations at 20 Hours

Treatment	Cell Growth (PD, % Control)	Percent Aberrant Cells	Frequency Abs per 100 Cells[a]	Percent Endo-reduplicated (Polyploid) Cells[b]
Without S-9 (3 hours)				
DMSO 1%	100	0.50	0.50	0.0 (1.4)
DMSO 1%	100	2.50	2.50	0.0 (1.2)
MMC (0.5 μM)[c]	82	15.00**	15.00	NS
MMC (1.5 μM)[d]	41	68.00**	108.00	NS
Elbasvir (μM)				
1.5	96	NS	N/A	N/A
5.0	93	NS	N/A	N/A
10	88	1.50	1.50	0.0 (1.6)
15	92	NS	N/A	N/A
20	91	2.00	2.00	0.0 (0.6)
25[e]	74	NS	N/A	N/A
30[f]	83	1.00	1.00	0.0 (1.4)
35[f]	Discarded	N/A	N/A	N/A
40[f]	Discarded	N/A	N/A	N/A

Confidential

2.6.7.B.8B　遺伝毒性試験 – In Vitro　**Study No.:** TT#[redacted]-8536 [資料4.2.3.3.1.4: TT#[redacted]-8536] (Continued)

TT#[redacted]-8536:　Assay for Chromosomal Aberrations (Continued)
Summary of Cytotoxicity and Aberrations at 20 Hours

Treatment	Cell Growth (PD, % Control)	Percent Aberrant Cells	Frequency Abs per 100 Cells[a]	Percent Endo-reduplicated (Polyploid) Cells[b]
Without S-9 (20 hours)				
DMSO 1%	100	1.00	1.00	0.0 (1.6)
DMSO 1%	100	2.00	3.50	0.0 (1.6)
Elbasvir (µM)				
1.5	92	NS	N/A	N/A
5.0	88	NS	N/A	N/A
10	91	0.00	0.00	0.0 (1.0)
15	92	NS	N/A	N/A

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.8B　遺伝毒性試験 – In Vitro　**Study No.:** TT#[redacted]-8536 [資料4.2.3.3.1.4: TT#[redacted]-8536] (Continued)

TT#[redacted]-8536:　Assay for Chromosomal Aberrations (Continued)
Summary of Cytotoxicity and Aberrations at 20 Hours

Treatment	Cell Growth (PD, % Control)	Percent Aberrant Cells	Frequency Abs per 100 Cells[a]	Percent Endo-reduplicated Cells[b]
20	95	2.50	3.50	0.0 (1.2)
25[e]	88	NS		
30[f]	95	1.50	3.50	0.0 (1.6)
35[f]	Discarded	N/A	N/A	N/A
40[f]	Discarded	N/A	N/A	N/A

a　The total number of aberrations per 100 cells, since a cell may have more than one aberration.
b　Endoreduplication:　Percentage of endoreduplicated cells based on 500 mitotic cells.　200 cells scored for aberrations per point except where noted.
c　100 cells scored for aberrations.
d　25 cells scored for aberrations.
e　Equivocal precipitate during treatment.
f　Precipitate clearly evident during treatment.
** $p \leq 0.01$ compared to the relevant control group using a one-sided Fisher's Exact Test.　Since several comparisons with a common control were made, an adjustment procedure of Dunnett was used to assess the overall significance of each comparison for doses of test compound.
CP = Cyclophosphamide and MMC = Mytomycin C are the positive controls.
DMSO = Dimethyl sulfoxide; N/A = Not applicable; NS = Not scored; PD = Population doubling.

Confidential

2.6.7.B.9　遺伝毒性試験 – In Vivo：非ピボタル試験

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rats / Crl:WI(Han)	Oral gavage (10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water/ Suspension)	4 days: bone marrow sampled the day after the final dose	30, 300 mg/kg	4M	Negative up to 300 mg/kg/day	TT#[redacted]-8730 [資料4.2.3.3.2.3: TT#[redacted]-8730]

M = Male.

Confidential

2.6.7.B.9A　遺伝毒性試験 – In Vitro：ラットの小核試験

Test Article: Elbasvir

Test for Induction of: Micronuclei in rat bone marrow polychromatic erythrocytes **Species/Strain:** Rat/Crl:WI(Han) **Age:** 8 weeks **Cells Evaluated:** Polychromatic erythrocytes (PCE) **No. of Cells Analyzed/Animal:** 2000 PCE	**Treatment Schedule:** Vehicle and high dose test article treated animals dosed twice daily (b.i.d.) for the duration of the study sampled one day after final treatment. Low and mid dose groups dosed once daily and sampled one day after the last treatment. **Sampling Time:** One day hours after final dose. **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation**: Control and high dose in 5% polysorbate 80 in deionized water (5:95; w/w), low and mid dose in 10% polysorbate 80 in deionized water (10:90; w/w)	**Study No.:** TT#[redacted]-6014 **Location in CTD:** Section [資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014] **GLP Compliance:** Yes **Date of Dosing**: [redacted]-[redacted] to [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Dose Selection: The high dose exceeds the limit dose for the micronucleus assay defined in international (ICH/OECD) guidances.		
Additional Comments Regarding Test: Positive control animals (Mitomycin C-treated) are from an exploratory study and were dosed once and harvested approximately 24 hours later.		
Toxic/Cytotoxic Effects: Toxicity and exposure data are described in the report for TT#[redacted]-6014 [資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014] [Sec. 2.6.6.B.3.3]. There was no test article-related mortality. There were decreases in body weight gain at ≥300 mg/kg/day with a decrease in food consumption at 1000 mg/kg b.i.d.		

Confidential

2.6.7.B.9A　遺伝毒性試験 – In Vivo　**Study No.:** TT#[redacted]-6014 [資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014] (Continued)

Genotoxic Effects: Negative. In each sex, no dose group had a statistically significant increase in micronucleus frequency over concurrent control by pairwise comparison. There was also no evidence for a dose relation from the statistical trend test. The statistical analysis includes an adjustment for multiplicity of testing. The assay would usually be considered positive if a significant increase in the frequency of micronucleated PCE ($p<0.05$) occurred at a minimum of 2 dose levels when compared with the concurrent vehicle control mean: either 2 doses at a given sacrifice time or 1 dose at each of 2 sacrifice times. There were statistically significant increases in micronucleated PCE in positive control animals treated with mitomycin C.
Evidence of Exposure: The animals were exposed to elbasvir, as shown by a toxicokinetic evaluation. Exposure data are described in the reports from studies TT#[redacted]-6014 [資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014] [Sec. 2.6.6.B.3.3] and TT#[redacted]-6017 [資料4.2.3.2.14: TT#[redacted]-6017] [Sec. 2.6.6.B.3.4].

Confidential

2.6.7.B.9A　遺伝毒性試験 – In Vivo　**Study No.:** TT#[redacted]-6014 [資料4.2.3.2.13: TT#[redacted]-6014] (Continued)

Treatment Dose	Harvest Time (Hr)	Females				Males			
		Total PCE	Total MN-PCE	MN-PCE/ 1000 PCE[a]	Percent PCE[b]	Total PCE	Total MN-PCE	MN-PCE/ 1000 PCE[a]	Percent PCE[b]
5% polysorbate 80 5 mL/kg/b.i.d.	N/A	20,000	40	2.0 ± 0.4	61.1 ± 1.8	20,000	30	1.5 ± 0.3	56.8 ± 3.0
Elbasvir 100 mg/kg/day	N/A	10,000	32	3.2 ± 0.9	60.3 ± 3.4	10,000	26	2.6 ± 0.2	61.0 ± 1.5
Elbasvir 300 mg/kg	N/A	10,000	23	2.3 ± 0.3	57.9 ± 1.7	10,000	33	3.3 ± 0.8	57.2 ± 4.2
Elbasvir 1000 mg/kg/b.i.d.	N/A	10,000	20	2.0 ± 0.6	62.5 ± 2.5	10,000	18	1.8 ± 0.2	60.0 ± 4.2
Mitomycin C 0.8 mg/kg	24	N/A	N/A	N/A	N/A	10,000	56	5.6 ± 1.4	54.3 ± 3.2
Mitomycin C 2.0 mg/kg	24	N/A	N/A	N/A	N/A	10,000	187	18.7 ± 4.8	50.0 ± 4.4

a　Group mean ± standard error.
b　PCE as a percent of 1000 total erythrocytes.
b.i.d. = Bis in die; MN-PCE = Micronucleated PCE; N/A = Not applicable; PCE = Polychromatic erythrocytes.
Mitomycin C-treated animals are from an exploratory study and were dosed once and harvested approximately 24 hours later.
Vehicle and high dose test article treated animals were dosed twice daily (b.i.d.) for the duration of the study and sampled one day after the last treatment.　The low and mid dose groups were dosed once daily and sampled one day after the last treatment.
Data shown are from 5 animals per treated group per sex and 10 animals per vehicle control group per sex, except for Mitomyci-C dosed animals, where 5 males per dose group were scored.
The vehicle control and high dose in 5% polysorbate 80 in deionized water (5:95; w/w), abbreviated as 5% polysorbate 80; the low and mid dose in 10% polysorbate 80 in deionized water (10:90; w/w).

Confidential

2.6.7.B.10　がん原性試験

In accordance with ICH S1A guidance, carcinogenicity studies were not conducted, given that the human use of the elbasvir is less than 6 months in duration and in the absence of any genotoxic signal in the battery of genotoxicity studies or proliferative signal in the chronic toxicity studies.

Confidential

2.6.7.B.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses (mg/kg)**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/ Crl:WI(Han)	Oral gavage (10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water)	GD 6 through 20	0, 30, 100, 300, 1000	6F	**1000 mg/kg/day**:　No test article-related maternal or developmental toxicity. **300 mg/kg/day**:　No test article-related maternal or developmental toxicity. **100 mg/kg/day**:　No test article-related maternal or developmental toxicity. **30 mg/kg/day**:　No test article-related maternal or developmental toxicity.	TT#[redacted]-7175 [資料4.2.3.5.2.14: TT#[redacted]-7175]

F = Female; GD = Gestation Day.

Confidential

2.6.7.B.11　生殖発生毒性試験：非ピボタル試験

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses (mg/kg)**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rabbit/ Dutch Belted	Oral gavage (10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water)	GD 7 through 20	0, 30, 100, 300, 1000	6F	**1000 mg/kg/day**:　No test article-related maternal or developmental findings. **300 mg/kg/day**:　No test article-related maternal or developmental findings. **100 mg/kg/day**:　No test article-related maternal or developmental findings. **30 mg/kg/day**:　No test article-related maternal or developmental findings.	TT#[redacted]-7185 [資料4.2.3.5.2.16: TT#[redacted]-7185]

F = Female; GD = Gestation Day.

Confidential

2.6.7.B.12A　生殖発生毒性試験：雌雄ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験（経口投与）

受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Test Article:　Elbasvir

Design similar to ICH 4.1.1?　Yes **Species/Strain**:　Rat/Crl:WI(Han) **Age at Study Start**:　Females:　~9 weeks; Males:　~11 weeks **Study Start Date**:　[redacted]-[redacted]-20[redacted]	**Day of Mating:**　GD 0 **Day of Cesarean-Section:**　GD 15 to 17; estimated GD 21 for 1 female in the 300-mg/kg/day dose group **Method of Administration**:　Oral gavage **Formulation:**　Suspension **Dosing Volume:**　5 mL/kg **Vehicle (Control):**　10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water	**Study Number:**　TT#[redacted]-7290 **Location in CTD:**　Vol.　　Section [資料4.2.3.5.1.2: TT#[redacted]-7290] **GLP Compliance:**　Yes
Special Features:　For cohabitation, high-dose females housed with untreated males, high-dose males housed with untreated females, mid-dose females housed with mid-dose males, low-dose females housed with low-dose males, control females housed with control males **Treatment Interval (females):**　15 days prior to cohabitation, during cohabitation, and through GD 7 or until the day removed from cohabitation **Treatment Interval (males):**　15 days prior to cohabitation, during cohabitation, and through one day prior to scheduled sacrifice (~6 weeks total)		
No-Observed-Effect Levels (NOEL):　≥1000 mg/kg/day (female fertility parameters); 300 mg/kg/day (male fertility parameters); 50 mg/kg/day (female general toxicity parameters); 50 mg/kg/day (male general toxicity parameters)		
No-Observed-Adverse-Effect Levels (NOAEL):　≥1000 mg/kg/day (female fertility parameters); ≥1000 mg/kg/day (male fertility parameters); ≥1000 mg/kg/day (female general toxicity parameters); ≥1000 mg/kg/day　(male general toxicity parameters)		

Confidential

2.6.7.B.12A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7290 [資料4.2.3.5.1.2: TT#[redacted]-7290] (Continued)

	Females				Males			
Daily Dose (mg/kg)	Control	50	300	1000	Control	50	300	1000
Toxicokinetics[a,b]								
$AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr)	N/A	2.75	8.64	15.1	N/A	5.96	11.5	19.5
C_{max} (μM)	N/A	0.416	0.965	1.10	N/A	0.584	0.916	1.37
T_{max} (hr)	N/A	2.0	4.0	4.0	N/A	2.0	4.0	8.0

Confidential

2.6.7.B.12A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7290 [資料4.2.3.5.1.2: TT#[redacted]-7290] (Continued)

	Females				Males			
Daily dose (mg/kg)	Control	50	300	1000	Control	50	300	1000
Number of Animals	20	20	20	20	20	20	20	20
Noteworthy Findings								
Mortality	0	0	0	0	0	0	0	0
Physical Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight Change[c]								
Study Weeks 1 to 3	-	-	-	-	42 g	-12	[-29]	[-33]
Study Weeks 3 to 7	-	-	-	-	46 g	+4	-2	-7
Food Consumption								
Females[d]								
PMD 4	19 g	-5	[-11]	[-16]	N/A	N/A	N/A	N/A
PMD 11; GD 5; GD 12	-	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
Males[e]								
Study Week 1	N/A	N/A	N/A	N/A	25.8 g	-3	[-16]	[-18]
StudyWeek 2	N/A	N/A	N/A	N/A	25.4 g	-8	[-9]	[-10]
Study Week 6	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.B.12A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7290 [資料4.2.3.5.1.2: TT#[redacted]-7290] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	Control F/ Control M	50 mkd F/ 50 mkd M	300 mkd F/ 300 mkd M	1000 mkd F/ Untreated M	Untreated F/ 1000 mkd M
Number of Animals	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
Noteworthy Findings (Continued)					
No. Females Cohabited	20	20	20	20	20
No. Females Bred	20	20	20	20	20
No. Pregnant Females	18	19	17	19	18
No. Nonpregnant Females	2	1	3	1	2
Time to Mating (4-day periods)	1.45	1.20	1.32	1.25	1.55
Mating Index (%)	100	100	100	100	100
Fecundity Index (%)	90	95	85	95	90
Fertility Index (%)	90	95	85	95	90

Confidential

2.6.7.B.12A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7290 [資料4.2.3.5.1.2: TT#[redacted]-7290] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	Control F/ Control M	50 mkd F/ 50 mkd M	300 mkd F/ 300 mkd M	1000 mkd F/ Untreated M	Untreated F/ 1000 mkd M
Number of Animals	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
Noteworthy Findings (Continued)					
Reproductive Parameters (Mean Values)					
No. Corpora lutea/pregnant female	13.8	12.9	13.8	13.0	13.4
No. Implantations/pregnant female	13.3	10.3	12.6	12.3	12.3
% Resorptions/implantations (L.M.)	4.0	9.4	2.1	4.2	4.2
% Dead fetuses/implantations (L.M.)	0.4	0	0.4	0	0
No. Live fetuses/pregnant female					
% Peri-implantation loss (L.M.)	3.2	23.8	8.8	6.7	10.5
% Postimplantation loss (L.M.)	4.4	9.4	2.5	4.2	4.2

Confidential

2.6.7.B.12A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7290 [資料4.2.3.5.1.2: TT#[redacted]-7290] (Continued)

Daily dose (mg/kg)	Control F/ Control M	50 mkd F/ 50 mkd M	300 mkd F/ 300 mkd M	1000 mkd F/ Untreated M	Untreated F/ 1000 mkd M
Number of Animals	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
Noteworthy Findings (Continued)					
Sperm Parameters (Mean Values ± S.D.)					
Sperm count/g cauda epididymis ($\times 10^6$)	814.0 ± 114.8	777.3 ± 159.0	789.1 ± 127.2	N/A	[701.2 ± 143.9]
Sperm motility (%)	86.8 ± 4.2	85.7 ± 7.2	85.1 ± 9.6	N/A	87.1 ± 6.3
Gross Examination[f]	-	-	-	-	-
Organ Weight					
Testes	-	-	-	-	-

Footnotes on following page.

Confidential

[a] Study Week 13 toxicokinetic data from the 3-Month Oral Toxicity Study in Rats (TT#[redacted]-6024) [資料4.2.3.2.15: TT#[redacted]-6024] [Sec. 2.6.6.B.3.5].
[b] Elbasvir concentrations in plasma from all control group animals at 4 hours postdose were below the lower limit of quantitation of the bioanalytical method (LLQ = 0.023 µM).
[c] Control value is the mean absolute gain (g) during the specified interval; treatment group values are the percent change from concurrent control.
[d] Measured over 3-day intervals ending on the specified days.　Control value is the mean value (g/day) during the specified interval; treatment group values are the percent change from concurrent control.
[e] Measured over one 3-day interval in the specified weeks.　Control value is the mean value (g/day) during the specified interval; treatment group values are the percent change from concurrent control.
[f] Limited to examination of the thoracic and abdominal viscera of control and treated females and males.
- = No noteworthy findings.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
F = Female; GD = Gestation Day; LLQ = lower Limit of Quantitation; L.M. = Litter Mean; M = Male; mkd = mg/kg/day; N/A = Not applicable; NE = Not examined; PMD = Premating Day; S.D. = Standard Deviation; SW = Study Week.
Mating Index = Mated females/females cohabited.
Fecundity Index = Pregnant females/mated females.
Fertility Index = Pregnant females/females cohabited.
% Peri-implantation loss = [(No. of corpora lutea – no. of implantations)/(no. of corpora lutea)] × 100.
% Postimplantation loss = [(No. of resorptions + no. of dead fetuses)/(no. of implantations)] × 100.

Confidential

2.6.7.B.13A　生殖発生毒性試験：ラットの胚・胎児発生毒性及びトキシコキネティクス試験（経口投与）

胚・胎児発生に対する作用

Test Article: Elbasvir

Design Similar to ICH 4.1.3? Yes **Species/Strain:** Rat/Crl:WI(Han) **Age on GD 0:** ~10 weeks **Study Start Date:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Special Features:** Toxicokinetics, GD 15	**Day of Mating**: GD 0 **Day of Cesarean-Section**: GD 21 **Method of Administration:** Oral gavage **Formulation:** Suspension **Dosing Volume:** 5 mL/kg **Vehicle (Control):** 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water	**Study Number**: TT#[redacted]-7170 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.5.2.15: TT#[redacted]-7170] **GLP Compliance**: Yes
Treatment Interval: GD 6 through 20 (females scheduled for cesarean-section), GD 6 through 15 (females scheduled for Toxicokinetic blood collection)		
No-Observed-Effect Levels (NOEL): 300 mg/kg/day (maternal toxicity); ≥1000 mg/kg/day (developmental toxicity)		
No-Observed-Adverse-Effect Levels (NOAEL): ≥1000 mg/kg/day (maternal toxicity); ≥1000 mg/kg/day (developmental toxicity)		

Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	50	300	1000
Maternal Toxicokinetics[a] – Gestation Day 15				
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μM•hr)	N/A	4.85	11.4	21.8
C_{max} (μM)	N/A	0.932	1.12	1.45
T_{max} (hr)	N/A	2.0	2.0	8.0

Confidential

2.6.7.B.13A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7170 [資料4.2.3.5.2.15: TT#[redacted]-7170] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	50	300	1000
Number of Animals				
Total No. Females	24	28	28	28
No. females Scheduled for Cesarean-Section	20	20	20	20
Noteworthy Findings				
Mortality (No. of Females)	0	0	0	0
Physical Examination	-	-	-	-
Body Weight Change[b]				
GD 6 to 21	105 g	-1.9	0	[-13]
GD 6 to Adjusted 21[c]	55.2 g	-3.8	-5.8	[-18.7]
Food Consumption	-	-	-	-
Gross Examination[d]	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.B.13A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7170 [資料4.2.3.5.2.15: TT#[redacted]-7170] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	50	300	1000
Number of Animals				
Total No. Females	24	28	28	28
No. females Scheduled for Cesarean-Section	20	20	20	20
Noteworthy Findings (Continued)				
Reproductive Parameters (Mean Values)				
No. Litters evaluated	20	19	19	20
No. Corpora lutea/pregnant female	11.7	11.7	12.6	12.4
No. Implantations/pregnant female	10.5	10.2	10.9	9.9
% Resorptions/implantations (L.M.)	5.1	3.1	4.7	5.4
% Dead fetuses/implantations (L.M.)	0	0	0	0
No. Live fetuses/pregnant female	9.9	9.8	10.4	9.3
% Peri-implantation loss (L.M.)	11.5	12.1	13.2	19.7
% Postimplantation loss (L.M.)	5.1	3.1	4.7	5.4
Fetal sex ratios	0.48	0.56	0.56	0.52
Live fetal weights (g)				
Females	4.84	4.93	4.92	4.88
Males	5.12	5.15	5.31	5.13

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.13A　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7170 [資料4.2.3.5.2.15: TT#[redacted]-7170] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	50	300	1000
Number of Animals				
Total No. Females	24	28	28	28
No. Females Scheduled for Cesarean-Section	20	20	20	20
Noteworthy Findings (Continued)				
Placental Morphology				
No. abnormal placentas/total examined	0/198	0/187	0/198	0/186
Fetal Morphology				
External examination	-	-	-	-
Visceral examination	-	-	-	-
Coronal examination	-	-	-	-
Skeletal examination	-	-	-	-

a　Elbasvir concentrations in plasma from all control group animals at 4 hours postdose were below the lower limit of quantitation of the bioanalytical method (LLQ = 0.023 μM).
b　Control value is the mean absolute gain (g) during the specified period; treatment group values are the mean percent change from concurrent control.
c　GD 21 maternal body weight adjusted for total fetal weight.
d　Limited to examination of the thoracic and abdominal viscera.
- = No noteworthy findings.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
GD = Gestation Day; LLQ = Lower Limit of Quantitation; L.M. = Litter Mean; N/A = Not applicable; TK = Toxicokinetics.
Fetal sex ratio = [Total no. live female fetuses/(total no. live female fetuses + total no. live male fetuses)].
% Peri-implantation loss = [(No. of corpora lutea – no. of implantations)/(no. of corpora lutea)] × 100.
% Postimplantation loss = [(No. of resorptions + no. of dead fetuses)/(no. of implantations)] × 100.

Confidential

2.6.7.B.13B　生殖発生毒性試験：ウサギの胚・胎児発生毒性及びトキシコキネティクス試験（経口投与）

胚・胎児発生に対する作用

Test Article: Elbasvir

Design Similar to ICH 4.1.3? Yes **Species/Strain:** Rabbit/Dutch Belted **Age on GD 0:** 26 to 29 weeks **Study Start Date:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Special Features:** Toxicokinetics, GD 15	**Day of Mating:** GD 0 **Day of Cesarean-Section**: GD 28 **Method of Administration:** Oral gavage **Formulation:** Suspension **Dosing Volume:** 5 mL/kg **Vehicle:** 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water	**Study Number:** TT#[redacted]-7180 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.5.2.17: TT#[redacted]-7180] **GLP Compliance**: Yes
Treatment Interval: GD 7 through 20 (females scheduled for cesarean-section), GD 7 through 15 (females scheduled for Toxicokinetic blood collection)		
No-Observed-Effect Levels (NOEL): ≥1000 mg/kg/day (maternal toxicity); ≥1000 mg/kg/day (developmental toxicity)		
No-Observed-Adverse-Effect Levels (NOAEL): ≥1000 mg/kg/day (maternal toxicity); ≥1000 mg/kg/day (developmental toxicity)		

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	30	100	1000
Maternal Toxicokinetics – Gestation Day 15				
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µM•hr)	N/A[a]	1.27	4.16	39.4
C_{max} (µM)	N/A[a]	0.333	0.517	1.93
T_{max} (hr)	N/A[a]	1.8	1.5	8.8

Confidential

2.6.7.B.13B　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7180 [資料4.2.3.5.2.17: TT#[redacted]-7180] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	30	100	1000
Number of Animals				
Total No. Females	23	23	23	23
No. Females Scheduled for Cesarean-Section	19	19	19	19
Noteworthy Findings				
Mortality (No. of Females)	0	0	0	0
Physical Examinations	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Gross Examination[b]	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.B.13B　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7180 [資料4.2.3.5.2.17: TT#[redacted]-7180] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	30	100	1000
Number of Animals				
Total No. Females	23	23	23	23
No. Females Scheduled for Cesarean-Section	19	19	19	19
Noteworthy Findings (Continued)				
Reproductive Parameters (Mean Values)				
No. Litters evaluated	19	19	19	19
No. Corpora lutea/pregnant female	7.7	8.0	7.9	7.7
No. Implantations/pregnant female	7.1	7.7	6.9	7.1
% Resorptions/implantations (L.M.)	1.3	1.4	2.2	5.9
% Dead fetuses/implantations (L.M.)	0	0	0	0
No. Live fetuses/pregnant female	7.0	7.6	6.7	6.7
% Peri-implantation loss (L.M.)	7.3	3.9	13.1	8.4
% Postimplantation loss (L.M.)	1.3	1.4	2.2	5.9
Fetal sex ratios	0.48	0.51	0.51	0.55
Live fetal weights (g)				
Females	31.4	31.0	32.6	31.4
Males	32.3	32.3	33.3	32.2

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.13B　生殖発生毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-7180 [資料4.2.3.5.2.17: TT#[redacted]-7180] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	30	100	1000
Number of Animals				
Total No. Females	23	23	23	23
No. Females Scheduled for Cesarean-Section	19	19	19	19
Noteworthy Findings (Continued)				
Placental Morphology				
No. abnormal placentas/total examined	0/133	0/144	0/128	0/127
Fetal Morphology				
External examination	-	-	-	-
Visceral examination	-	-	-	-
Coronal examination	-	-	-	-
Skeletal examination	-	-	-	-

a　Elbasvir concentration in plasma from 1 of 4 control group animals at 8 hours postdose was above the lower limit of quantitation of the bioanalytical method (LLQ = 0.023 µM) and was less than 11% of the mean Cmax value of the low-dose group.　Based on the low concentration of the test article observed in the plasma of one control animal at only one time point, as compared to the higher concentrations measured in the plasma of the low-dose treated animals, this event does not compromise the validity or reliability of the toxicokinetic evaluation.
b　Limited to examination of the thoracic and abdominal cavities.
- = No noteworthy findings.
#/# = number affected/number examined.
Fetal sex ratio = [Total no. live female fetuses/(total no. live female fetuses + total no. live male fetuses)].
% Peri-implantation loss = [(No. of corpora lutea – no. of implantations)/(no. of corpora lutea)] × 100.
% Postimplantation loss = [(No. of resorptions + no. of dead fetuses)/(no. of implantations)] × 100.
GD = Gestation Day; LLQ = lower Limit of Quantitation; L.M. = Litter Mean; N/A = Not applicable.

Confidential

2.6.7.B.14　生殖発生毒性試験：ラットの出生前及び出生後の発生毒性試験（経口投与）

出生前及び出生後の発生並びに母体機能に対する作用

Test Article: Elbasvir

Design Similar to ICH 4.1.2? Yes **Species/Strain:** Rat/Crl:WI(Han) **Age at Study Start:** ~10 weeks **Study Start Date:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Day of Mating:** GD 0 **Treatment Interval (F_0 generation)**: GD 6 through LD 20	**Method of Administration:** Oral gavage **Formulation:** Suspension **Dosing Volume:** 5 mL/kg **Vehicle (Control):** 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water **Litters Culled/Not Culled**: Culled to 4/sex/litter on PND 3	**Study Number:** TT#[redacted]-7020 **Location in CTD: Vol.** Section [資料4.2.3.5.3.2: TT#[redacted]-7020] **GLP Compliance:** Yes

Special Features: For cohabitation of the F_1 generation (1 female:1 male; non-siblings), control group females were housed with control group males, low-dose group females were housed with low-dose group males, mid-dose group females were housed with mid-dose group males, high-dose group females were housed with control group males, and high-dose group males were housed with control group females.

No-Observed-Effect Level: 300 mg/kg/day (F_0 generation); ≥1000 mg/kg/day (F_1 generation)

No-Observed-Adverse-Effect Level: ≥1000 mg/kg/day (F_0 generation); ≥1000 mg/kg/day (F_1 generation)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)[a]	50	300	1000
Maternal Toxicokinetics (GD 15)[b]				
$AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr)	N/A	4.85	11.4	21.8
C_{max} (μM)	N/A	0.932	1.12	1.45
T_{max} (hr)	N/A	2.0	2.0	8.0
Number of F_0 Females at Study Start	20	20	20	20

Confidential

2.6.7.B.14　生殖発生毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-7020 [資料4.2.3.5.3.2: TT#[redacted]-7020] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	50	300	1000
F_0 Generation				
No. of Mated Females	20	20	20	20
No. of Pregnant Females	19	19	20	19
Mortality - No. of Females	0	0	0	0
Physical Signs	-	-	-	-
Body Weight Gain[c]				
GD 6 to 8	9.5 g	+6.3	-23	[-47]
GD 8 to 21	90 g	-4.0	0	+2.9
LD 0 to 21	-	-	-	-
Food Consumption[d]				
GD 6 to 8	19.1 g	+2.1	-3.7	[-13]
GD 12 to 14; GD 18 to 20	-	-	-	-
Mean Length of Gestation (days)	21.8	22.0	21.7	21.7
No. of Pregnant Females Failing to Initiate/Complete Parturition	0	0	0	0
No. of F_0 Females with Live Pups on LD 0/LD 21	18/18	19/19	20/18	19/19
Gross Examination[e]	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.B.14　生殖発生毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-7020 [資料4.2.3.5.3.2: TT#[redacted]-7020] (Continued)

Daily Dose (mg/kg; F_0 Generation only)	0 (Control)	50	300	1000
F_1 Generation - preweaning				
No. of Parental Females	19	19	20	19
No. of Implantations/Pregnant Female	11.8	10.7	11.0	11.9
Total Pups Delivered	197	189	209	217
Live Pups/Litter on PND 0	10.9	9.9	10.5	11.4
No. Dead Pups on PND 0 (No. of Litters)	0	0	0	0
Sex Ratio	0.48	0.48	0.47	0.53
% Postimplantation Survival, L.M.	92.3	92.7	95.0	96.1
Pup External Morphology on PND 0	-	-	-	-
No. of Pup Deaths (No. of Litters)				
PND 1 to 3	2 (2)	1 (1)	0	1 (1)
PND 4 to 21	1 (1)	0	0	0
Live Pup Weights (g; Female/Male)				
PND 0	5.56/5.99	5.84/6.16	5.58/5.82	5.47/5.70
PND 7	15.3/16.2	16.3/17.1	15.9/16.3	15.5/16.2
PND 14	31.9/33.3	33.8/34.9	33.0/33.8	31.9/32.6
PND 21	48.7/51.3	51.9/53.8	50.2/51.7	48.9/49.9
Physical Signs	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.B.14　生殖発生毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-7020 [資料4.2.3.5.3.2: TT#[redacted]-7020] (Continued)

Daily Dose (mg/kg; F_0 Generation only)	0 (Control)	50	300	1000
F_1 Generation - postweaning				
No. of animals (Females/Males)	36/36	37/37	36/35	38/38
Mortality	0	0	0	0
Physical Signs	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-
Vaginal Opening (mean day of occurrence)	34.4	34.2	33.6	34.1
Preputial Separation (mean day of occurrence)	43.6	44.1	43.6	44.9
Behavioral Tests (~20/sex/group)				
Passive Avoidance	-	-	-	-
Auditory Startle Habituation	-	-	-	-
Open Field Motor Activity	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.B.14　生殖発生毒性試験

Study No.: TT#[redacted]-7020 [資料4.2.3.5.3.2: TT#[redacted]-7020] (Continued)

Daily Dose (mg/kg; F_0 Generation only)	Control F/ Control M	50 mkd F/ 50 mkd M	300 mkd F/ 300 mkd M	1000 mkd F/ Control M	Control F/ 1000 mkd M
F_1 Generation - postweaning					
No. of Animals Cohabited (F/M)	18/18	19/19	18/18	18/18	18/18
No. Females Bred	17	19	18	18	18
No. Pregnant Females	16	19	17	18	17
No. Nonpregnant Females	1	0	1	0	1
Mean Time to Mating (in 4-day periods)	1.00	1.00	1.24	1.21	1.18
Reproductive Parameters (Mean Values) (Cesarean-section between GD 15 and 17)					
No. of Corpora Lutea/Pregnant Female	12.4	13.2	12.6	12.8	12.8
No. Implantations/Pregnant Female	11.4	10.8	11.0	11.0	10.6
% Resorptions/Implantations, L.M.	3.3	5.2	3.9	6.2	2.8
% Dead Fetuses/Implantations, L.M.	0	1.2	0.5	5.9	0
No. Live Fetuses/Pregnant Female	11.1	10.3	10.5	10.6	10.3
% Peri-implantation loss, L.M.	7.7	16.6	14.5	13.3	16.5
% Postimplantation loss, L.M.	3.3	6.4	4.3	6.2	2.8

Footnotes on following page.

Confidential

[a] Elbasvir concentrations in plasma from all control group animals at 4 hours postdose were below the lower limit of quantitation of the bioanalytical method (LLQ = 0.023 μM).
[b] GD 15 toxicokinetic data from TT#[redacted]-7170 [資料4.2.3.5.2.15: TT#[redacted]-7170] (Oral Embryo Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats).
[c] Control value is the mean absolute gain (g) during the specified period; treatment group values are the percent change from concurrent control.
[d] Control value is the mean value (g/day) during the specified period; treatment group values are the percent change from concurrent control.
[e] Examination limited to thoracic and abdominal viscera.
GD = Gestation Day; F = Female; LD = Lactation Day; L. M. = Litter Mean; M = Male; N/A = Not applicable; PND = Postnatal Day.
- = No noteworthy findings.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
% Peri-implantation loss = [(No. of corpora lutea – no. of implantations)/(no. of corpora lutea)] × 100.
% Postimplantation loss = [(No. of resorptions + no. of dead fetuses)/(no. of implantations)] × 100.
% Postimplantation survival = [Live pups delivered/higher of (metrial glands or total pups delivered)] x 100.
Sex Ratio = Total no. of live female pups/total no. of live female and male pups.

Confidential

2.6.7.B.15　生殖発生毒性試験：出生児（幼若動物）投与／評価試験

Elbasvir is not intended for administration to children in this filing, nonclinical studies were not performed in which the offspring (juvenile animals) were directly dosed.　However, the elbasvir nonclinical program (conducted in young animals, generally sexually immature at study initiation) and clinical program did not identify any major age-related safety concerns.　Additionally, since elbasvir is present in rat milk, juvenile rats were indirectly exposed to elbasvir during lactation in the rat postnatal developmental toxicity study.　Therefore, this nonclinical program is considered adequate to support the clinical development of a pediatric indication.

Confidential

2.6.7.B.16　局所刺激性試験

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Isolated Bovine Cornea	In vitro (MEM/paste)	4 hours	20%	N/A	Elbasvir was classified as a non irritant.	TT#[redacted]-7807 [資料4.2.3.6.3: TT#[redacted]-7807]
EpiDerm™ tissues	Dermal (MTT/solution)	1, 4, 24 hours	100 mg/ EpiDerm™ tissues	N/A	Elbasvir was classified as a non irritant.	TT#[redacted]-7806 [資料4.2.3.6.4: TT#[redacted]-7806]

MEM = Minimum Essential Medium; MTT = methyl thiazol tetrazolium diluted in Dulbecco's Modified Eagle's Medium; N/A = Not applicable.

Confidential

2.6.7.B.17　その他の毒性試験：非ピボタル試験

免疫毒性試験

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mouse/ CBA/J	Dermal (DMF/Solution)	3 days	5, 10, 25%	6F	Elbasvir was not a dermal sensitizer.	TT#[redacted]-7805 [資料 4.2.3.7.2.2: TT#[redacted]-7805]

DMF = N, N-Dimethylformamide; F = Female.

Confidential

2.6.7.B.17　その他の毒性試験（続き）

光毒性試験

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/ Crl:LE (Long-Evans)	Oral gavage (10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water)	3 days[a]	100, 1000	*Photoxicity Component*: 5M/group *Bioanalytical Component*: 3M/group	**Phototoxicity Component:** 1000 mg/kg/day:　No skin reactions or ocular observations indicative of phototoxicity. **100 mg/kg/day**:　No skin reactions or ocular observations indicative of phototoxicity. **Bioanalytical Component:** Concentrations of the test article below the limit of quantitation in all control rats. Quantifiable elbasvir in all plasma samples of test article-dosed rats in a dose-dependent manner, and consistent with previous studies conducted at the same doses.	TT#[redacted]-9042 [資料 4.2.3.7.7.5: TT#[redacted]-9042]

a　30-minute UVR exposure on Study Day 3 approximately 4 hours (control and low-dose group) or 6 hours (high-dose group) after dosing.
M = Male.

Confidential

2.6.7.B.17　その他の毒性試験（続き）

その他

Test Article:　Elbasvir

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Human Whole Blood	In vitro (15% (w/w) hydroxyl-propyl beta-cyclodextrin, 0.075 (v/w) L-lactic acid, 0.5% (v/w) ethanol, 0.3125% (v/w) 1N NaOH in deionized water/ Solution)	15 minutes	0 (placebo: 1:512-1:1), 0.00002 to 0.01 mg/mL[a]	N/A	No hemolysis at any dose.	TT#[redacted]-7800 [資料 4.2.3.7.7.7: TT#[redacted]-7800]

a　Elbasvir formulation containing 0.01% (w/w) elbasvir in the vehicle, or placebo (vehicle) diluted in saline to achieve specified dilution/concentrations.
N/A = Not applicable.

Confidential

2.6.7.B.17A　その他の毒性試験：イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験（＋3ヵ月間休薬期間）

回復性試験

Test Article:　Elbasvir

Species/Strain: Dog/Beagle **Initial Age:** 28 to 37 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** 5 mL/kg	**Duration of Dosing:** 1 month **Duration of Postdose:** 3 months **Method of Administration:** Oral gavage **Vehicle/Formulation:** 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water/Suspension	**Study Number:** TT#[redacted]-1031 **Location in CTD:** Vol.　Section [資料4.2.3.7.7.6: TT#[redacted]-1031] **GLP Compliance:** Yes[a]

Special Features: Study performed in females only. Scheduled necropsies were performed at the end of the dosing period (6 dogs/group) and after an approximately 3-month treatment-free period (6 elbasvir-treated dogs). Originally, a 6-month treatment-free period was scheduled on the study. However, elbasvir-related changes observed after the 1-month dose administration had resolved at the end of the 3-month free period. Therefore, the remaining 6 elbasvir-treated dogs that were designated to the original 6-month treatment-free period were returned to the colony. Transmission electron microscopy examination in the mesenteric lymph nodes.
No-Observed-Adverse-Effect Level: ≥1000 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1000
Number of Animals	F:6[b]	F:18[c]
Toxicokinetics[d] – Study Day 1		
$AUC_{0-24\ hr}$ (μM•hr)	N/A	27.1
C_{max} (μM)	N/A	2.12
T_{max} (hr)	N/A	12

Confidential

2.6.7.B.17A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-1031 [資料 4.2.3.7.7.6: TT#[redacted]-1031] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1000
Number of Animals	F:6[b]	F:18[c]
Noteworthy Findings		
Mortality (No. of Animals)	-	-
Body Weight		
Study Week 5:　End of dosing period (%)[e]	8.2	-11
Study Week 16:　End of 3-month treatment free period (kg)[f]	N/A	9.2
Body Weight Change (kg)[g]		
Pretest to Study Week 1	+0.1	[-0.2][h]
Pretest to Study Week 5 (end of dosing period)	+0.5	[-0.2][i]
Pretest to Study Week 16 (end of 3-month treatment free period)	N/A	+1.5

Confidential

2.6.7.B.17A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-1031 [資料4.2.3.7.7.6: TT#[redacted]-1031] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1000
Number of Animals	F:6[b]	F:18[c]
Noteworthy Findings (Continued)		
Clinical Observations		
Dosing period		
Discoloration of feces (white)	0/6	[18/18]
Emesis (sporadic)		
Liquid	0/6	[8/18]
Food	2/6	[4/18]
Foamy	0/6	[2/18]
Thin	0/6	[2/18][j]
Decreased skin turgor	0/6	[1/18][j]
Three-month treatment-free period	N/A	-

Confidential

2.6.7.B.17A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-1031 [資料4.2.3.7.7.6: TT#[redacted]-1031] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1000
Number of Animals	F:6[b]	F:18[c]
Noteworthy Findings (Continued)		
Gross Pathology (Incidence)	-	-
Histomorphology (Incidence)		
End of dosing period		
Peyer patches		
Vacuolation	0/6	[6/6]
Large intestine		
Lymphoid tissue, vacuolation	0/6	[6/6]
Lymph nodes		
Vacuolation	0/6	[6/6]
Spleen		
Lymphoid tissue, vacuolation	0/6	[5/6]
End of three-month treatment free period	N/A	-

Confidential

2.6.7.B.17A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-1031 [資料 4.2.3.7.7.6: TT#[redacted]-1031] (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1000
Number of Animals	F:6[b]	F:18[c]
Noteworthy Findings (Continued)		
Additional Examinations		
Transmission Electron Microscopy		
End of Dosing Period		
Number of Animals Evaluated	6	1
Lymph nodes		
Increased number of lysosomes containing myelin figures, consistent with phospholipidosis	0/6	[1/1]
End of 3-month treatment-free period		
Number of Animals Evaluated	0	6
Lymph nodes	N/A	-

Footnotes on following page.

Confidential

2.6.7.B.17A　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-1031 [資料4.2.3.7.7.6: TT#[redacted]-1031] (Continued)

---

a GLP compliant with the exception of the analysis of physical stability which was performed using a non-GLP assay.
b All control dogs were necropsied at the end of the 1-month dosing period.
c 6 elbasvir-treated dogs were necropsied following the 3-month treatment-free period.　The 6 remaining elbasvir-treated dogs were returned to the colony.
d Elbasvir concentrations in plasma from all control animals were below the lower limit of quantitation (LLQ = 0.0227 μM).
e For controls, group mean is shown.　For dose group, percent difference from controls is shown.
f Group mean is shown.
g Control and treatment group values are mean absolute values.
h Body weight loss in the majority of the elbasvir-treated dogs.
i Body weight loss in half of the elbasvir-treated dogs.
j Correlating with body weight loss.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
#/# = number affected/number examined.
F = Female; N/A = Not applicable.

Confidential

2.6.7.B.17B　その他の毒性試験：イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験

併用投与毒性試験

Test Article: Grazoprevir/Elbasvir

Species/Strain: Dog/Beagle **Initial Age:** 34 to 46 weeks **Date of First Dose:** [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Dose Volume:** Grazoprevir: 2 mL/kg; Elbasvir: 5 mL/kg	**Duration of Dosing:** 1 month **Duration of Postdose:** None **Method of Administration:** Oral Grazoprevir: capsules; Elbasvir: gavage **Vehicle/Formulation:** Grazoprevir: 100% PEG 400/Solution; Elbasvir: 10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water/Solution	**Study Number:** TT#[redacted]-6051 **Location in CTD:** Vol. Section [資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051] **GLP Compliance:** Yes[a]
Special Features: Evaluation of grazoprevir and elbasvir liver concentrations		
No-Observed-Adverse-Effect Level: 5 mg/kg/day/25 mg/kg/day (Grazoprevir/Elbasvir)		

Grazoprevir/Elbasvir - **Daily Dose (mg/kg)**	0/0[b] (Control)		5/0[c]		0/25[d]		5/25	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Toxicokinetics[e] - Study Day 1								
Grazoprevir/Elbasvir - **$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)**	N/A	N/A	40.4/N/A	34.4/N/A	N/A/13.9	N/A/7.19	63.4/10.7	53.3/8.65
Grazoprevir/Elbasvir - **C_{max} (µM)**	N/A	N/A	6.14/N/A	6.79/N/A	N/A/0.886	N/A/0.563	5.82/0.742	5.42/0.606
Grazoprevir/Elbasvir - **T_{max} (hr)**	N/A	N/A	2.7/N/A	2.0/N/A	N/A/5.3	N/A/3.3	5.3/5.3	5.3/3.3

Confidential

2.6.7.B.17B　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6051 [資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051] (Continued)

Grazoprevir/Elbasvir - **Daily Dose (mg/kg)**	0/0[b] (Control)		5/0[c]		0/25[d]		5/25	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Toxicokinetics[e] - Study Week 5								
Grazoprevir/Elbasvir - **$AUC_{0-24\ hr}$ (µM•hr)**	N/A	N/A	35.4/N/A	25.2/N/A	N/A/9.87	N/A/5.66	71.1/14.7	49.3/4.48
Grazoprevir/Elbasvir - **C_{max} (µM)**	N/A	N/A	7.54/N/A	4.80/N/A	N/A/0.890	N/A/0.471	7.14/1.36	6.10/0.522
Grazoprevir/Elbasvir - **T_{max} (hr)**	N/A	N/A	2.3/N/A	2.0/N/A	N/A/3.3	N/A/3.0	2.7/3.3	4.7/2.7
Grazoprevir/Elbasvir - **Liver Concentrations (µM)[f,g] - Final Necropsy**	N/A	N/A	8.52/N/A	3.88/N/A	N/A/6.60	N/A/5.49	13.4/8.38	10.1/4.25
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[h]	7.8 kg	9.6 kg	0.0	-3.1	2.6	3.1	-9.0	-3.1
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.B.17B　その他の毒性試験

Study No.:　TT#[redacted]-6051 [資料4.2.3.7.7.2: TT#[redacted]-6051] (Continued)

Grazoprevir/Elbasvir - **Daily Dose (mg/kg)**	0/0[b] (Control)		5/0[c]		0/25[d]		5/25	
Number of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Noteworthy Findings (Continued)								
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis/Urine Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology (Incidence)								
Lymph node								
Lymphoid tissue, vacuolation	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-	[2/3]	-
Peyer's patches								
Lymphoid tissue, vacuolation	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-	[2/3]	-
Large Intestine								
Lymphoid tissue, vacuolation	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-	[1/3]	-

Footnotes on following page.

Confidential

a With the exception of the liver homogenate analysis of grazoprevir which was non-GLP due to insufficient coverage for long term and freeze-thaw cycles stability.
b 100% PEG 400 (capsules)/10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water (gavage).
c Grazoprevir (capsules)/10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water (gavage).
d 100% PEG 400 (capsules)/Elbasvir (gavage).
e Grazoprevir and elbasvir concentrations in plasma from control group animals were below the lower limit of quantitations (Grazoprevir LLQ = 0.013 µM; elbasvir LLQ = 0.023 µM).
f Assuming a liver density of 1.0.
g Grazoprevir and elbasvir concentrations in liver from control group animals were below the lower limit of quantitations (Grazoprevir LLQ = 0.104 µM; elbasvir LLQ = 0.227 µM).
h At end of dosing period (Study Week 4). For controls, group means are shown. For dose groups, percent differences from controls are shown.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
= Number examined/Number affected.
- = No noteworthy findings.
F = Female; M = Male; N/A = Not applicable; PEG = Polyethylene Glycol.

Confidential