ベムリディ錠 25 mg

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.1　緒言

ギリアド・サイエンシズ株式会社

(0000)

目次

1　医薬品の構造及び薬理学的特性に関する簡潔な情報 5

2　申請する効能・効果、用法・用量 6

3　参考文献 7

図目次

図 2.6.1 - 1　TAF フマル酸塩の化学構造 5

略号一覧

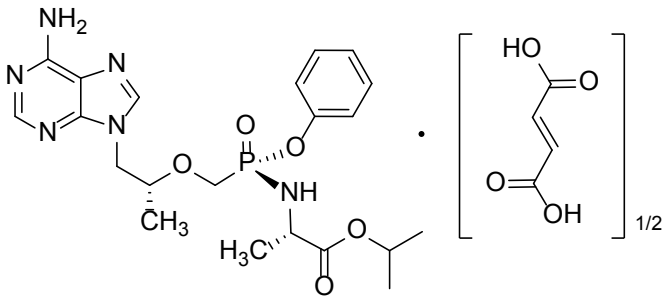
略号	日本語	英語
CES1	カルボキシルエステラーゼ 1	carboxylesterase 1
DNA	デオキシリボ核酸	deoxyribonucleic acid
HBV	B 型肝炎ウイルス	hepatitis B virus
HIV-1	ヒト免疫不全ウイルス-1	human immunodeficiency virus type 1
OAT	有機アニオントランスポーター	organic anion transporter
OATP	-	organic anion transporting polypeptide
RT	逆転写酵素	reverse transcriptase
TAF	テノホビル アラフェナミド	tenofovir alafenamide (GS-7340)
TDF	テノホビル ジソプロキシルフマル酸塩	tenofovir disoproxil fumarate
TFV	テノホビル	tenofovir, PMPA
TFV-DP	テノホビル二リン酸	tenofovir diphosphate

1　医薬品の構造及び薬理学的特性に関する簡潔な情報

テノホビル アラフェナミド（開発コード：GS-7340、TAF）はテノホビル（TFV）のプロドラッグであり、B 型慢性肝炎治療のために単剤として、あるいはヒト免疫不全ウイルス-1（HIV-1）感染治療のために他の抗ウイルス薬との配合錠として開発されている。原薬は TAF フマル酸塩である。TFV は B 型肝炎ウイルス（HBV）逆転写酵素（RT）及び HIV-1 RT を阻害するヌクレオチドアナログである。TFV のバイオアベイラビリティは低い。テノホビル ジソプロキシルフマル酸塩（TDF）は、B 型慢性肝炎の治療を適応とする既承認のプロドラッグである（販売名：テノゼット®錠 300mg）。

TAF は標的細胞で速やかに加水分解されて TFV となり、その後連続的にリン酸化されて活性代謝物であるテノホビル二リン酸（TFV-DP）となる。TFV-DP は HBV RT 及び HIV-1 RT の阻害剤であり、ウイルスのデオキシリボ核酸（DNA）鎖の伸長を停止させる［1、2］。TAF フマル酸塩の化学構造を図 2.6.1 - 1 に示す。

図 2.6.1 - 1　TAF フマル酸塩の化学構造



TAF は血漿中で TDF より安定であるため、TDF の約 1/10 の投与量でも細胞内 TFV-DP 濃度は高く、循環血中 TFV 濃度は約 90%低かった［3、4、5］（2.7.2.2.3.1.1 項）。この TAF 特有の代謝メカニズムにより、TDF と比較して優れた臨床プロファイルを示す可能性がある。

TAF と典型的な代謝酵素との相互作用は少なく、ヒト初代肝細胞では主にカルボキシルエステラーゼ 1（CES1）によって加水分解される［4、5、6］。さらに、*in vitro* で TAF は、受動輸送及び肝取り込みトランスポーターである organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 及び OATP1B3 の寄与により、効率的に肝細胞に取り込まれることが示された［6］。効率的に取り込まれた後に細胞内で代謝されるため、*in vitro* での TAF 添加時の細胞内 TFV-DP 濃度は TFV 添加時の 120 倍、及び TDF 添加時の 5 倍高かった［6］。したがって、TAF は TFV を肝臓に移行させやすいことが示された。イヌに TAF を経口投与したとき、約 65%が肝臓で初回通過代謝を受けて、高い肝臓中 TFV-DP 濃度が認められたことは、B 型慢性肝炎治療のために活性体を効率的に肝臓に移行させるというコンセプトを支持するものである［6、7］。

TFV とは異なり、TAF は腎取り込みトランスポーターである有機アニオントランスポーター（OAT）1 及び OAT3 の基質ではなく、相互作用も示さないため、これらのトランスポーターが一

過性に発現したヒト腎上皮細胞において OAT 依存的な細胞毒性を示さない。したがって、TAF は OAT を介して腎近位尿細管に蓄積しないと考えられる。TAF は尿細管細胞における TFV の蓄積には寄与しないと考えられるため、腎細胞中 TFV 濃度は血漿中 TFV 濃度と相関し、TAF 錠投与時の血漿中 TFV 濃度は、TDF 投与時と比較すると約 90%低下する。TFV の全身循環が低いこと、及び TFV-DP の細胞内濃度が高いことより、TDF 投与時のリスクとして知られている腎毒性及び骨密度低下は軽減される［8、9、10］（2.7.4.2.1.5 項）。

2　申請する効能・効果、用法・用量

＜予定する効能・効果＞

B 型肝炎ウイルスの増殖を伴い肝機能の異常が確認された B 型慢性肝疾患における B 型肝炎ウイルスの増殖抑制

＜予定する用法・用量＞

通常、成人にはテノホビル アラフェナミドとして 1 回 25 mg（テノホビル アラフェナミドフマル酸塩として 28 mg）を 1 日 1 回経口投与する。

3　参考文献

1 Yokota T, Konno K, Shigeta S, Holy A, Balzarini J, De Clercq E. Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogues of hepatitis B virus DNA synthesis in HB611 cells. Antivir Chem Chemother 1994;5 (2):57-63. (4.3.102)

2 Cherrington JM, Allen SJW, Bischofberger N, Chen MS. Kinetic interaction of the diphosphates of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine and other anti-HIV active purine congeners with HIV reverse transcriptase and human DNA polymerases α, β, and γ. Antivir Chem Chemother 1995;6 (4):217-21. (4.3.18)

3 Lee WA, He G-X, Eisenberg E, Cihlar T, Swaminathan S, Mulato A, et al. Selective intracellular activation of a novel prodrug of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor tenofovir leads to preferential distribution and accumulation in lymphatic tissue. Antimicrob Agents Chemother 2005;49 (5):1898-906. (4.3.53)

4 Birkus G, Kutty N, He GX, Mulato A, Lee W, McDermott M, et al. Activation of 9-[(R)-2-[[(S)-[[(S)-1-(Isopropoxycarbonyl)ethyl]amino] phenoxyphosphinyl]-methoxy]propyl]adenine (GS-7340) and other tenofovir phosphonoamidate prodrugs by human proteases. Mol Pharmacol 2008;74 (1):92-100. (4.3.9)

5 Birkus G, Kutty N, He G-X, Mulato A, Lee W, McDermott M, et al. Activation of GS-7340 and Other Tenofovir Phosphonoamidate Prodrugs by Human Proteases. Antiviral Res 2007;74:A57. (4.3.10)

6 Murakami E, Wang T, Park Y, Hao J, Lepist EI, Babusis D, et al. Implications of Efficient Hepatic Delivery by Tenofovir Alafenamide (GS-7340) for Hepatitis B Virus Therapy. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59 (6):3563-9. (4.3.75)

7 Babusis D, Phan TK, Lee WA, Watkins WJ, Ray AS. Mechanism for Effective Lymphoid Cell and Tissue Loading Following Oral Administration of Nucleotide Prodrug GS-7340. Mol Pharm 2013;10 (2):459-66. (4.3.3)

8 Gilead Sciences Inc. VIREAD® (tenofovir disoproxil fumarate) Tablets and Powder for oral use VIREAD® (tenofovir disoproxil fumarate) powder, for oral use. US Prescribing Information. Foster City, CA. Revised October 2013. (4.3.37)

9 Department of Health and Human Services (DHHS). HHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents Recommends a Fixed-Dose Combination Product of

Elvitegravir/Cobicistat/Tenofovir/Emtricitabine as an Alternative Regimen in Antiretroviral Treatment-Naive Individuals with HIV-1 Infection. 2012:1-2. (4.3.26)

10 Agarwal K, Fung SK, Nguyen TT, Cheng W, Sicard E, Ryder SD, et al. Twenty-eight day safety, antiviral activity, and pharmacokinetics of tenofovir alafenamide for treatment of chronic hepatitis B infection. J Hepatol 2015;62 (3):533-40. (4.3.1)

ベムリディ錠 25 mg

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.2　薬理試験の概要文

ギリアド・サイエンシズ株式会社

(0000)

目次

1　まとめ 11
1.1　効力を裏付ける試験 11
1.2　副次的薬理試験 12
1.3　安全性薬理試験 13
1.4　薬力学的薬物相互作用 13
2　効力を裏付ける試験 14
2.1　作用機序 14
2.1.1　細胞への取り込み 14
2.1.2　TAF の *in vitro* 活性化及び代謝 14
2.1.3　TAF の *in vitro* ローディング 19
2.1.4　TAF の *in vivo* 代謝 24
2.1.5　HBV（及び HIV-1）逆転写酵素の阻害 26
2.2　*In vitro* 抗 HBV 活性 28
2.2.1　野生型 HBV 臨床分離株に対する TAF の活性 28
2.2.2　TAF（及び TFV）血清／血漿中タンパク結合率 29
2.3　*In vivo* 抗 HBV 活性 29
2.3.1　動物のヘパドナウイルスに対する TDF の活性 29
2.4　*In vitro* 選択性指数 30
2.4.1　TAF の抗 HBV 活性及び細胞毒性 30
2.5　*In vitro* HBV 耐性 30
2.6　薬剤耐性変異株に対する *in vitro* 抗 HBV 活性 31
2.6.1　ヌクレオシ（チ）ド耐性変異導入 HBV 分離株に対する TAF の活性 31
3　副次的薬理試験 33
3.1　オフターゲット阻害の *in vitro* 評価 33
3.1.1　細胞内 DNA ポリメラーゼに及ぼす TFV-DP の影響 33
3.1.2　レセプター結合能に及ぼす TDF 及び TFV の影響 34

3.2 *In vitro* 細胞毒性 34
3.2.1 ヒト初代末梢血単核球（PBMC）及び骨格筋細胞（SkMC）に対する細胞毒性 34
3.2.2 肝細胞株及び T リンパ芽球様細胞株における細胞毒性 36
3.2.3 ヒト骨髄前駆細胞及び赤血球前駆細胞における造血毒性 37
3.2.4 腎トランスポーター依存的細胞毒性 38
3.2.5 ヒト初代骨芽細胞における細胞傷害性 40
3.2.6 ミトコンドリア毒性 41
3.3 ヒト及び動物のウイルス 46
3.3.1 ヒト及び動物のウイルス分離株に対する TAF の活性 46
3.4 ヒト免疫不全ウイルス（HIV） 48
3.4.1 *In vitro* 抗 HIV 活性 48
3.4.2 *In vitro* 選択性指数 50
3.4.3 *In vitro* における HIV-1 耐性の評価 51
3.4.4 *In vitro* における薬剤耐性変異株に対する抗 HIV 活性の評価 54
4 安全性薬理試験 57
4.1 中枢神経系 57
4.2 心血管系 57
4.2.1 *In vitro* 57
4.2.2 *In vivo* 57
4.3 消化器系 58
4.4 腎臓系 58
5 薬力学的薬物相互作用 59
5.1 既存の N(t)RTI との併用下における TFV の代謝活性化 59
5.2 併用による *in vitro* 抗 HBV 活性 60
5.2.1 TFV 及び既存の N(t)RTI との併用による抗 HBV 活性 60
5.2.2 TAF の抗 HBV 活性に及ぼすプロテアーゼ阻害剤の影響 61
5.3 併用による *in vitro* 抗 HIV 活性 62

5.3.1 TAF 及び抗レトロウイルス薬との併用による抗 HIV 活性 62
5.3.2 TAF の抗 HIV 活性に及ぼす PI の影響 63
5.4 併用による *in vitro* 抗 HCV 活性 64
5.4.1 抗ウイルス薬の抗 HCV 活性に及ぼす TAF の影響 64
6 考察及び結論 66
6.1 効力を裏付ける試験 66
6.2 副次的薬理試験 67
6.3 安全性薬理試験 68
6.4 薬力学的薬物相互作用 69
6.5 結論 69
7 参考文献 70

表目次

表 2.6.2- 1　肝細胞株での CES1 及び CatA の発現 17

表 2.6.2- 2　HepG2 及び HepAD38 細胞での TAF（100 μmol/L）の加水分解に対する CES1 及び CatA 阻害剤の影響 17

表 2.6.2- 3　CatA による TAF（10 μmol/L）の加水分解に対する COBI、HIV-1 PI 及び HCV PI の影響 19

表 2.6.2- 4　PBMC での TAF ローディングにおける細胞内 TFV-DP 濃度 22

表 2.6.2- 5　$CD4^+$ T 細胞サブセットでの TAF（400 nmol/L）ローディングにおける 細胞内 TFV-DP 濃度 23

表 2.6.2- 6　ヒト初代骨芽細胞での TAF ローディングにおける細胞内 TFV-DP 濃度 24

表 2.6.2- 7　アカゲザルにおける TAF（モノフマル酸塩）単回経口投与後の PBMC 内 TFV 濃度 25

表 2.6.2- 8　ジェノタイプ A～H の臨床分離株に対する TAF の抗ウイルス活性 28

表 2.6.2- 9　HepG2 細胞における TAF の抗 HBV 活性及び細胞毒性 30

表 2.6.2- 10　ヌクレオシ（チ）ド耐性変異導入 HBV 分離株の TAF に対する感受性 32

表 2.6.2-11　ヒト DNA ポリメラーゼ（α、β及びγ）及びラット DNA ポリメラーゼ（δ及びε） 並びにウイルス RT に対する TFV-DP の Ki/Km 比 33

表 2.6.2-12　ヒト DNA ポリメラーゼ（α、β及びγ）による TFV-DP 及び NRTI-TP の DNA 取り込み効率 34

表 2.6.2-13　分裂期及び静止期ヒト PBMC に対する TAF、GS-7339、TDF 及び TFV の *in vitro* 細胞毒性 35

表 2.6.2-14　肝細胞株及び T リンパ芽球様細胞株に対する TAF 及び既存の HIV 阻害剤の *in vitro* 細胞毒性 37

表 2.6.2-15　TAF 及び 5-フルオロウラシルの *in vitro* 造血毒性比較 38

表 2.6.2-16　OAT1 及び OAT3 存在／非存在下での HEK293T 細胞に対する TAF 及び TFV の *in vitro* 細胞毒性 39

表 2.6.2-17　TFV、cidofovir 及び ADV の *in vitro* 腎近位尿細管毒性 40

表 2.6.2-18　ヒト初代骨芽細胞に対する TAF の *in vitro* 細胞毒性 41

表 2.6.2-19　HepG2 細胞の mtDNA 量に対する TAF の作用 42

表 2.6.2-20　ヒト分化 RPTEC の mtDNA 量に対する TFV 及び NRTI の作用 44

表 2.6.2-21　細胞外乳酸産生に対する TFV 及び NRTI の作用 45

表 2.6.2- 22　各種ヒトウイルス及びサル免疫不全ウイルス（SIV）に対する TAF 及び TFV の抗ウイルス活性 47

表 2.6.2- 23　HIV-1 臨床分離株に対する TAF の抗ウイルス活性 49

表 2.6.2- 24　HIV-2 臨床分離株に対する TAF の抗ウイルス活性 50

表 2.6.2- 25　TAF、TFV 及び TDF の抗 HIV 活性及び細胞毒性 51

表 2.6.2- 26　TAF 及び TFV 耐性発現試験における HIV-1 遺伝子型及び表現型解析 52

表 2.6.2- 27　ヌクレオシ（チ）ド耐性変異 HIV-1 臨床分離株に対する TAF 及び TFV の抗ウイルス活性 55

表 2.6.2- 28　TFV（10 mol/L）及び ABC（10 μmol/L）単独又は併用による各代謝物濃度並びに dATP 及び dGTP 濃度に対する作用 59

表 2.6.2- 29　TFV と既存の N(t)RTI との併用による抗 HBV 活性 60

表 2.6.2- 30　HepAD38 細胞での TAF の抗 HBV 活性に対する COBI 及び各種 PI の影響 61

表 2.6.2- 31　HepAD38 細胞での TAF の抗 HBV 活性に対する CatA 及び CES1 阻害の影響 62

表 2.6.2- 32　TAF 及び抗レトロウイルス薬との併用による抗 HIV 活性 63

表 2.6.2- 33　ヒト初代 $CD4^+$ T リンパ球における TAF の抗 HIV 活性に対する COBI 及び各種 PI の影響 64

表 2.6.2- 34　HCV ジェノタイプ 1a レプリコン細胞における直接／非直接作用型抗 HCV 薬の 抗 HCV 活性及び細胞毒性に対する TAF の影響 65

図目次

図 2.6.2- 1　TAF の細胞内活性化経路.....15

図 2.6.2- 2　ヒト初代肝細胞における TAF（0.5 μmol/L）から TFV-DP への代謝に対する CatA、CES1 及び CYP3A4 阻害剤の影響.....16

図 2.6.2- 3　HepAD38 細胞での TAF（0.5 μmol/L）の代謝に対する CatA 及び CES1 阻害剤の影響.....18

図 2.6.2- 4　ヒト初代肝細胞での TAF（5 μmol/L）ローディングにおける 細胞内 TFV-DP 濃度推移（24 時間インキュベーション）.....20

図 2.6.2- 5　ヒト初代肝細胞での TAF（5 μmol/L）ローディングにおける 細胞内 TFV-DP 濃度推移（2 時間パルスインキュベーション後 22 時間ウォッシュアウト）.....21

図 2.6.2- 6　TFV-DP による HBV pol/RT の DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性抑制作用.....26

図 2.6.2- 7　TAF 及びそのジアステレオマーGS-7339 の構造式.....35

図 2.6.2- 8　HepG2 細胞の mtDNA 量に対する TFV 及び NRTI の作用.....42

図 2.6.2- 9　ヒト骨格筋細胞の mtDNA 量に対する TFV 及び NRTI の作用.....43

図 2.6.2- 10　耐性変異 HIV-1 臨床分離株に対する TAF 及び TFV の耐性プロファイル.....56

略号及び用語の定義

略号	日本語	英語
ABC	アバカビル	abacavir
ADV	アデホビル ピボキシル	adefovir pivoxil, a prodrug form of AFV
AFV	アデホビル	adefovir
ATV	アタザナビル	atazanavir
BMD	骨密度	bone mineral density
BNPP	-	bis-p-nitrophenyl phosphate
CatA	カテプシン A	cathepsin A
CC_{50}	50%細胞毒性濃度	drug concentration that results in a 50% reduction in cell viability
CES1	カルボキシルエステラーゼ 1	carboxylesterase 1
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	Chinese hamster ovary
C_{max}	最高濃度	maximum observed concentration of drug
COBI	コビシスタット	cobicistat
COX	シトクロム c オキシダーゼ	cytochrome c oxidase
CYP	シトクロム P450	cytochrome P450
d4T	スタブジン	stavudine
dATP	デオキシアデノシン三リン酸	deoxyadenosine triphosphate
ddATP	ジデオキシアデノシン三リン酸（ddI の活性代謝物）	dideoxyadenosine triphosphate, active metabolite of ddI
ddCTP	ジデオキシシチジン三リン酸（ddC の活性代謝物）	deoxycytidine triphosphate, active metabolite of ddC
ddC	ザルシタビン	zalcitabine
DDDP	DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ	DNA-dependent DNA polymerase
ddI	ジダノシン	didanosine
DMSO	ジメチルスルホキシド	dimethylsulfoxide
DNA	デオキシリボ核酸	deoxyribonucleic acid
dNTP	2’-デオキシヌクレオシド三リン酸	2’-deoxynucleoside triphosphate
EC_{50}	50%効果濃度	half maximal effective concentration or concentration of compound inhibiting virus replication by 50%
ECG	心電図	electrocardiogram
EFV	エファビレンツ	efavirenz
EVG	エルビテグラビル	elvitegravir
f.b.e	遊離塩基換算	free base equivalent
FTC	エムトリシタビン	emtricitabine
ETV	エンテカビル	entecavir
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
GS-7339	TAF のジアステレオマー	diastereomer of TAF, GS-7340

略号及び用語の説明（続き）

略号	日本語	英語
HBV	B 型肝炎ウイルス	hepatitis B virus
HCV	C 型肝炎ウイルス	hepatitis C virus
HEK	ヒト胚腎臓	human embryonic kidney
HEPES	-	4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子	human ether-à-go-go related gene
HIV-1	ヒト免疫不全ウイルス 1 型	human immunodeficiency virus type 1
IC_{50}	50%阻害濃度	half maximal inhibitory concentration or concentration of compound causing 50% of maximal inhibition
K_i	阻害定数	affinity constant for enzyme inhibition
K_m	ミカエリス定数	Michaelis constant; substrate concentration at which the enzyme reaction rate is half-maximal
INSTI	インテグラーゼ阻害剤	integrase strand transfer inhibitor
LAM	ラミブジン	lamivudine
LC/MS/MS	高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー法	high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
LMNC	リンパ節単核球	lymph node mononuclear cell
LPV	ロピナビル	lopinavir
MDM	単球由来マクロファージ	monocyte-derived macrophage
mtDNA	ミトコンドリア DNA	mitochondrial DNA
NFV	ネルフィナビル	nelfinavir
NNRTI	非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤	nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor
NRTI	ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤	nucleoside reverse transcriptase inhibitor
NtRTI	ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤	nucleotide reverse transcriptase inhibitor
OAT1/3	有機アニオントランスポーター 1/3	organic anion transporter 1/3
OATP	-	organic anion transporting polypeptide
PBMC	末梢血単核球	peripheral blood mononuclear cell
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応試験	polymerase chain reaction
P-gp	P-糖蛋白	P-glycoprotein
PHA	フィトヘマグルチニン	phytohemagglutinin
PI	プロテアーゼ阻害剤	protease inhibitor
PNP	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ	purine‐nucleoside phosphorylase
Pol	ポリメラーゼ	polymerase
PTC	腎近位尿細管細胞	renal proximal tubular cell
RDDP	RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ	RNA-dependent DNA polymerase

略号及び用語の説明（続き）

略号	日本語	英語
RNase	リボヌクレアーゼ	ribonuclease
RPTECs	腎近位尿細管上皮細胞	renal proximal epithelial tubule cells
RT	逆転写酵素	reverse transcriptase
SD	標準偏差	standard deviation
SIV	サル免疫不全ウイルス	simian immunodeficiency virus
SkMC	骨格筋細胞	skeletal muscle cell
TAF	テノホビル アラフェナミド、GS-7340	tenofovir alafenamide, formerly GS-7340
TAM	チミジンアナログ変異	thymidine-analog mutations
TBV	テルビブジン	telbivudine
3TC	ラミブジン	lamivudine
TDF	テノホビルジ ソプロキシルフマル酸塩	tenofovir disoproxil fumarate
TFV	テノホビル	tenofovir
TFV-Ala	テノホビル-アラニン	TFV-Alanine
TFV-DP	テノホビル二リン酸	tenofovir diphosphate
TFV-MP	テノホビル一リン酸	tenofovir monophosphate
t_{max}	最高濃度到達時間	time (observed time point) of C_{max}
TP	三リン酸	triphosphate
$t_{½}$	消失半減期	half-life
WHV	ウッドチャック肝炎ウイルス	woodchuck hepatitis virus
ZDV	ジドブジン	zidovudine

1　まとめ

本資料は B 型慢性肝炎の治療薬としてのテノホビル アラフェナミド（TAF、開発コード：GS-7340）フマル酸塩錠の医薬品販売承認申請をサポートするために提出する。TAF はヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤（NtRTI）テノホビル（TFV）のプロドラッグである。TFV は経口バイオアベイラビリティの低いヌクレオチドアナログであり、B 型肝炎ウイルス（HBV）逆転写酵素（RT）及びヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）RT を阻害する。テノホビル ジソプロキシルフマル酸塩（TDF、販売名：テノゼット錠 300mg）は、B 型慢性肝炎の治療を適応とする既承認の TFV のプロドラッグである。

本項では TAF（及び TFV）を用いた効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験に関して、TAF の薬理学的活性を詳細に評価した。

1.1　効力を裏付ける試験

標的細胞においてTAFはTFVに速やかに加水分解され、続いて活性代謝物テノホビル二リン酸（TFV-DP）へとリン酸化される［1、2］。TFV-DPはHBV RT及びHIV-1 RTのヌクレオチド阻害剤であり、逆転写過程でデオキシアデノシン三リン酸（dATP）の取り込みを競合的に阻害してデオキシリボ核酸（DNA）鎖の伸長を停止させる［3、4］。

TAFは*in vitro*で受動輸送及び寄与は少ないが、肝取り込みトランスポーターであるorganic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 及びOATP1B3 により、効率的に肝細胞に取り込まれることが示された［5］。HBVの標的であるヒト初代肝細胞で、TAFは主にカルボキシルエステラーゼ 1（CES1）によってTFVへと加水分解され、カテプシンA（CatA）の寄与は小さかった。一方、HIV-1 の標的であるヒト初代リンパ球系細胞において、TAFを加水分解してTFVを生成する主な酵素はCatAであった。TAFの効率的な取り込みと細胞内代謝により、ヒト初代肝細胞でのTFV-DPの細胞内濃度はTFV及びTDF添加時と比較してそれぞれ約 120 倍及び約 5 倍高かった［5］（本項 2.1 章）。

アカゲザルでの TAF（モノフマル酸塩）50 mg/kg 単回経口投与後の血漿中 TAF 及び TFV 濃度は、それぞれ最高濃度到達時間（t_{max}）0.5 及び 1 時間で速やかに上昇した。末梢血単核球（PBMC）での TFV 濃度は 96 時間まで維持され、明らかに血漿中より消失が遅かった。ビーグル犬に TAF（モノフマル酸塩）10 mg/kg 単回経口投与後、TAF は速やかに吸収され、血漿中 TAF の t_{max} は 0.08 時間であり、その後 0.24 時間の消失半減期（$t_{1/2}$）で速やかに消失した。血漿中の主な代謝物は TFV であり、C_{max} は 2.23 µmol/L であった。肝臓中の主な代謝物は TFV-DP であり、投与 4.0 時間後で C_{max} 126 µmol/L に達した（本項 2.1 章）。

HepG2 細胞（肝細胞株）において、TAF は野生型ジェノタイプ A～H の HBV 臨床分離株に対して同程度の抗 HBV 活性を示し、その平均 50%効果濃度（EC_{50}）は 86.6 nmol/L であった（本項 2.2 章）。TAF は、検討した最高濃度（44400 nmol/L）まで細胞傷害性を示さず、HepG2 細胞での抗 HBV 活性に対する選択性は>513 倍だった（本項 2.4 章）。短期（4 週間）及び長期（48 週間）*in vivo* 抗 HBV 作用試験において、ウッドチャック肝炎ウイルス（WHV）感染ウッドチャックに TDF を経口投与したところ、WHV に対する TDF の抗ウイルス活性が示された（本項 2.3 章）。

持続的に HBV が増殖する確立した組織培養アッセイ系がないため、TAF に対する *in vitro* 耐性発現試験は実施していない。しかし、TAF に対する感受性にわずかな低下が認められた二重耐性変異体（rtA181V + rtN236T）を除いて、TAF は一連のラミブジン（LAM）、エンテカビル（ETV）及びアデホビル ピボキシル（ADV）耐性変異体に対して強力な抗 HBV 活性を維持した。また、TFV でも同様の結果が得られた（本項 2.6 章）。

1.2　副次的薬理試験

TFV-DP はほ乳類 DNA ポリメラーゼ α、β、δ、ε 及びミトコンドリア DNA（mtDNA）ポリメラーゼ γ に対して極めて弱い阻害作用しか持たず、TDF 及び TFV はいずれもリガンドの宿主タンパク質への結合に対して阻害又は活性化作用を示さなかった（本項 3.1 章）。

TAF（又は TFV）は細胞内 mtDNA 量、シトクロム c オキシダーゼ（COX）複合体 II 及び IV 発現、脂質蓄積並びに乳酸産生に有意な影響を及ぼさなかったことから、TAF が mtDNA 合成を阻害し、NRTI 関連のミトコンドリア毒性を引き起こす可能性は低いことが示唆された。

TAF（又は TFV）は、肝細胞株（HepG2 細胞）、静止期及び分裂期の PBMC、T リンパ芽球様細胞（MT-2 及び MT-4 細胞）、ヒト初代骨芽細胞並びにヒト初代腎近位尿細管上皮細胞（RPTECs）に対して細胞傷害性をほとんど示さなかった。また、TAF はヒトの赤血球前駆細胞及び骨髄前駆細胞の増殖にほとんど影響を及ぼさなかった。

TFV とは異なり、TAF は腎有機アニオントランスポーター（OAT）1 又は OAT3 と相互作用せず、これらのトランスポーターの基質ともならない。また、これらのトランスポーターを発現したヒト腎上皮細胞に対して OAT 依存的な細胞傷害性を示さなかった（本項 3.2 章）。以上の結果は、TAF の腎臓に対する安全性プロファイルが改善されている可能性を示唆している

In vitro 抗ウイルス活性試験の結果から、TAF は免疫不全ウイルス［HIV-1、HIV-2 及びサル免疫不全ウイルス（SIV）］に対しても特異性の高い抗ウイルス薬であることが示された。一方、検討した他のウイルス病原体［アデノウイルス、2 型デング熱ウイルス、インフルエンザ A 型ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、RS ウイルス（RSV）、コクサッキーB 群ウイルス、ライノウイルス、単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）及び 2 型（HSV-2）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、ワクニシアウイルス、HCV］に対しては、有意な *in vitro* 活性を示さなかった（本項 3.3 及び 3.4 章）。

TAFはヒト初代PBMCにおいて、M群サブタイプA～Gを含む全てのHIV-1 群（M、N、O）に対して幅広い抗HIV活性を示し、平均EC_{50}値は 0.10～12.0 nmol/Lの範囲であった。TAFはHIV-2 に対しても強力な抗ウイルス活性を示し、EC_{50}値は 0.91～2.63 nmol/Lの範囲であった。TAFの活性化PBMC及びヒトTリンパ芽球様細胞株に対する細胞傷害性は弱く、抗HIV活性に対してそれぞれ 1943 倍及び 1997 倍超の選択性を示した。TDF及びTFV耐性に関与するHIV-1 RTの変異は主にK65Rであり、少なからずK70Eも関連していることが明らかになっている［6、7、8］。用量漸増耐性発現試験において、TAFのHIV-1 耐性プロファイルはTFVとほぼ同様であった。生理的濃度のTAF存在下で行ったウイルスブレイクスルー実験では、既存のTFV耐性変異を有するほとんどのウイルスにおいてブレイクスルーが抑制され、TAFは既存のTDF耐性ウイルスに対して抗ウイルス効果を示すことが示唆された。様々なNtRTI及びヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NRTI）

耐性変異を有する一連のHIV-1 臨床分離株に対して、TAFの抗ウイルス作用に対する感受性はTFVとほぼ同様であり、両薬剤のEC_{50}値の平均変化倍率（FC）に強い相関が認められた（本項3.4 章）。

1.3　安全性薬理試験

中枢神経系（本項 4.1 章）、心血管系（本項 4.2 章）、消化管系（本項 4.3 章）及び腎臓系（本項 4.4 章）に対する TAF の影響を評価した。TAF（モノフマル酸塩）単回経口投与で、ラットの中枢神経系（1000 mg/kg）及び腎臓系（1000 mg/kg）並びにイヌの心血管系（100 mg/kg）に対する薬理学的作用は認められなかった。ラットに TAF（モノフマル酸塩）1000 mg/kg を単回経口投与した時、胃排出の低下が認められたが、100 mg/kg では認められなかった。TAF（1 及び 10 µmol/L）はヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウム電流に対する有意な阻害作用を示さなかった。（本項 4.2.1 章）。

1.4　薬力学的薬物相互作用

HBV を導入した HepAD38 細胞を用いて *in vitro* 相互作用試験を実施し、TFV と N(t)RTI との併用による抗 HBV 活性の相加効果～相乗効果が示された。また HepAD38 細胞において、PI は TAF の抗 HBV 活性に対して相互的拮抗作用を示さなかった（本項 5.2 章）。HIV-1_{IIIB} 感染 MT-2 細胞を用いた *in vitro* 相互作用試験において、TAF は N(t)RTI、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NNRTI）、PI 及びインテグラーゼ阻害剤（INSTI）との併用により相加的～相乗的な抗 HIV 活性を示した。CatA を発現するヒト初代 $CD4^+$ T 細胞では、テラプレビル又は boceprevir と TAF との併用により TAF の抗 HIV-1 活性が低下した（本項 5.3 章）。HCV ジェノタイプ 1a Huh-7 レプリコン細胞を用いた *in vitro* 相互作用試験において、TAF は HCV PI の抗 HCV 活性及び細胞傷害性に有意な影響を及ぼさなかった（本項 5.4 章）。

2　効力を裏付ける試験

2.1　作用機序

2.1.1　細胞への取り込み

（試験番号 AD-120-2022、添付資料番号 4.2.2.6.11、評価資料）
（試験番号 AD-120-2042、添付資料番号 4.2.2.6.12、評価資料）

TFV には 2 つの負電荷が存在するため細胞透過性が制限され、腸吸収性が低く経口投与することができない。TAF には、荷電しているホスホン酸部分を遮蔽する親油性基が含まれるため、それによって透過性が高まり、標的細胞及び組織に TFV を効率的に送達することができる。

TAF の標的細胞及び組織への移行メカニズムを明らかにするため、輸送試験を実施した。この試験では、野生型及び形質移入チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いて、TAF が肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であるか否かを検討した（試験番号 AD-120-2022）［5］。細胞を TAF 又は対照化合物と 37ºC で 1 分間インキュベーション後、試料を有機溶媒で抽出し、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー（LC/MS/MS）法によって分析した。全ての化合物は、OATP 阻害剤であるリファンピシン（40 µmol/L）の存在下又は非存在下で評価した。

野生型 CHO 細胞において TAF は 9.0 pmol/min/10^6 cells の速度で取り込まれたことから、受動的透過性が高いことが示された。OATP1B1 及び OATP1B3 を導入した細胞（それぞれ CHO-OATP1B1 細胞及び CHO-OATP1B3 細胞）での TAF の取り込み速度は、野生型と比較してそれぞれ 30%及び 168%増大した。リファンピシン存在下での TAF 取り込み速度は、CHO-OATP1B1 細胞及び CHO-OATP1B3 細胞でそれぞれ 48%及び 76%低下した。以上の結果から、TAF は受動的透過性が高いが、同時に肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 及び OATP1B3 の基質でもあることが示された。

ヒト初代肝細胞において TAF の取り込みに対するリファンピシンの影響を *in vitro* で検討した（試験番号 AD-120-2042）。4 例の異なるドナーから採取した肝細胞を用いた結果から、TAF の取り込みに対する OATP を介した輸送の影響は小さいことが示唆された。

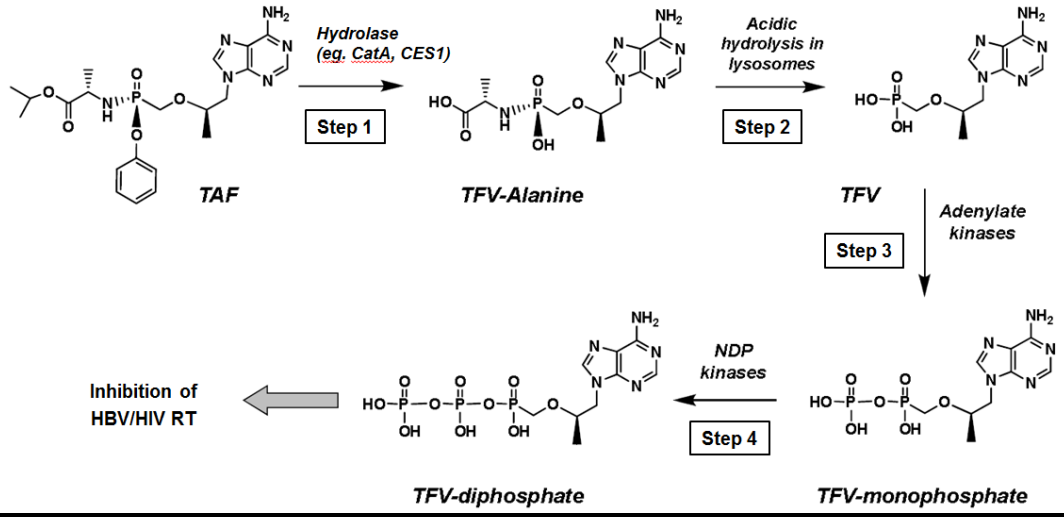
2.1.2　TAFの*in vitro*活性化及び代謝

TFVのプロドラッグであるTAF及びTDFは、いずれも代謝されて活性代謝物TFV-DPとなる［9、1］。TFV-DPはHBVポリメラーゼ／RT（HBV pol/RT）及びHIV-1 RTを競合的に阻害し、ウイルスDNA鎖の伸長を停止する［10、4、3］。TAFはTFVの標的細胞及び組織への移行性がTDFよりも改善されるように設計され、その結果TFV-DPの細胞内濃度上昇及びTFVの血中濃度低下をもたらす（2.7.2.2.3.1.1 項）［11］。

TAFが細胞に取り込まれた後、加水分解酵素（CES1、CatAなど）によりプロドラッグのカルボキシルエステル結合が切断され、中間代謝物であるTFV-アラニン（TFV-Ala）が遊離する。

TFV-Alaは更に加水分解されてTFVとなり、続いてアデニル酸キナーゼ及びヌクレオチド二リン酸キナーゼによりリン酸化されて活性代謝物TFV-DP（図 2.6.2- 1）が生成される［1、12、5］。

図 2.6.2- 1　TAFの細胞内活性化経路



CatA = cathepsin A; CES1 = carboxylesterase 1; NDP = nucleoside diphosphate; RT = reverse transcriptase;
TAF = tenofovir alafenamide; TFV = tenofovir; HBV = hepatitis B virus; HIV = human immunodeficiency virus
Source: Report PC-320-2006

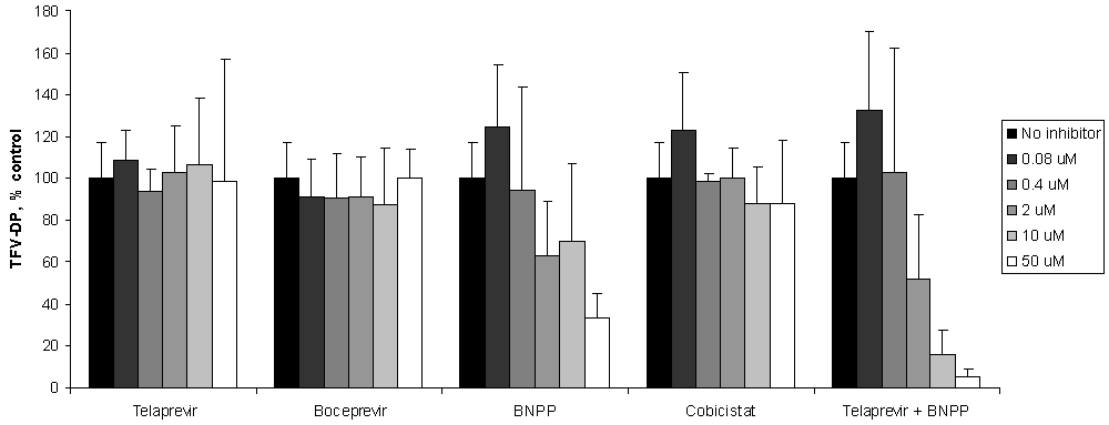
2.1.2.1　　ヒト初代肝細胞でのTAF活性化

（試験番号 AD-120-2031、添付資料番号 4.2.2.6.7、評価資料）

PBMC及びマクロファージを用いたTAFの細胞内代謝に関する研究により、TAFのエステル結合はリソソームのCatAにより切断されることが明らかとなっている［13、12］。ヒト初代肝細胞におけるTAFの活性化に関与する酵素を特定するため、CatA阻害剤（テラプレビル及びboceprevir）、CES1 阻害剤（bis-p-nitrophenyl phosphate：BNPP）、シトクロムP450（CYP）3A4 及びP-糖蛋白（P-gp）の阻害剤（コビシスタット：COBI）又はテラプレビル及びBNPPの両剤併用の存在下又は非存在下で、細胞抽出物中におけるTAFの加水分解酵素活性を評価した（試験番号 AD-120-2031）［5］。

BNPP は TAF（0.5 µmol/L）の代謝を用量依存的に阻害し、BNPP 2、10 及び 50 µmol/L での阻害率はそれぞれ約 37%、30%及び 66%であった（図 2.6.2- 2）。テラプレビル、boceprevir 及び COBI は TFV-DP の生成にほとんど影響を及ぼさなかった。テラプレビル単剤ではほとんど影響を認めなかったが、テラプレビル及び BNPP の併用は、より高濃度の BNPP 単剤よりも強い阻害を示した。例えば、各阻害剤（テラプレビル及び BNPP）の濃度を 10 及び 50 µmol/L としたとき、両阻害剤の併用により TFV-DP の生成はそれぞれ約 84%及び 95%阻害された。上記の結果から、ヒト初代肝細胞で TAF を活性化する主な酵素は CES1 であり、CatA もわずかに寄与していることが示唆される。

図 2.6.2- 2　ヒト初代肝細胞におけるTAF（0.5 µmol/L）からTFV-DPへの代謝に対するCatA、CES1 及びCYP3A4 阻害剤の影響



BNPP = bis-p-nitrophenyl phosphate; TFV-DP = tenofovir diphosphate; TAF = tenofovir alafenamide; CatA = cathepsin A; CES1 = carboxylesterase 1; CYP = cytochrome P450
Primary human hepatocytes were continuously incubated with 0.5 µmol/L TAF for 24 hours in the presence of increasing concentrations of inhibitors. Data represent mean ± SD values from 3 independent experiments in primary human hepatocytes from different donors in duplicate.
Source: Report AD-120-2031, [5]

2.1.2.2　　肝細胞株（HepG2 及びHepAD38）でのTAF活性化

（試験番号 PC-320-2006、添付資料番号 4.2.1.1.1、評価資料）

CatA 及び CES1 は TAF の代謝において極めて重要な役割を果たすことから、CatA 及び CES1 の細胞内濃度の差が TAF の抗ウイルス活性に影響を及ぼす可能性がある。抗ウイルス試験で一般的に使用される 2 つの肝細胞株（HepG2 及び HepAD38）を用いて、CatA 及び CES1 の発現レベルと、TAF の酵素活性化及び代謝におけるこれらの寄与を評価した（試験番号 PC-320-2006）。

両肝細胞株の抽出物におけるCES1 の発現レベルは、プールしたヒト肝S9 画分での発現レベルの 1/17～1/43 であった（表 2.6.2- 1）。一方、両肝細胞株の抽出物におけるCatAの発現レベルは、プールしたヒト肝S9 画分での発現レベルの 2.4～4.8 倍であった。肝細胞株とプールしたヒト肝S9 画分においてCES1 発現量の違いが認められたが、CES1 発現の抑制は肝細胞株に共通した現象である可能性がある［5、14、15］。

表 2.6.2- 1　肝細胞株でのCES1 及びCatAの発現

Cells	Relative Concentration (ng/µg Total Protein)	
	CES1	CatA
HepG2	0.9	2.9
HepAD38	2.3	5.7
Pooled Human Liver S9 Fraction	39.0	1.2
Pooled Human Intestinal S9 Fraction	< 0.1	1.4

CatA = cathepsin A; CES1 = carboxylesterase 1
Data shown represent the mean values of three independent experiments.
Source: Report PC-320-2006

HepG2 及び HepAD38 細胞の抽出物における TAF の加水分解活性及び代謝について、CatA 阻害剤（テラプレビル）又は CES1 阻害剤（BNPP）の存在下と非存在下で評価した。BNPP は試験した最高濃度まで（50 µmol/L）、HepG2 及び HepAD38 細胞のいずれにおいても TAF の加水分解に対して影響を及ぼさなかった。一方、テラプレビルは両 HepG2 及び HepAD38 細胞で TAF の TFV-Ala への加水分解を強力に阻害し、その 50%阻害濃度（IC_{50}）値はそれぞれ 0.2 及び 0.1 µmol/L と同程度であった（表 2.6.2- 2）。

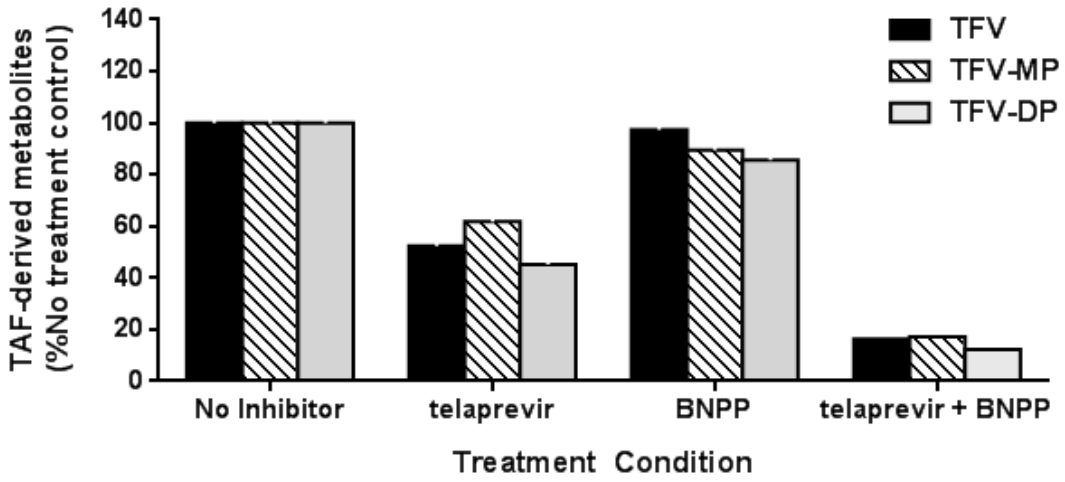
表 2.6.2- 2　HepG2 及びHepAD38 細胞でのTAF（100 µmol/L）の加水分解に対する CES1 及びCatA阻害剤の影響

Cell Type	Target (Inhibitor Class)	Compound	IC_{50} (µmol/L)
HepG2	CES1 (N/A)	BNPP	> 50
	CatA (HCV PI)	telaprevir	0.2
HepAD38	CES1 (N/A)	BNPP	> 50
	CatA (HCV PI)	telaprevir	0.1

TAF = tenofovir alafenamide;BNPP = bis-p-nitrophenyl phosphate; Cat A = cathepsin A; CES1 = carboxylesterase 1; IC_{50} = 50% inhibitory concentration;
PI = protease inhibitor; N/A = not applicable
Source: Report PC-320-2006.

さらに、TAF（0.5 µmol/L）と HepAD38 細胞をインキュベートした結果、テラプレビルは TAF の TFV-DP への代謝を阻害し、生成量を 1/2.2 倍まで顕著に阻害したが、BNPP の影響は無視できる程度であった（1/1.2 倍）（図 2.6.2- 3）。テラプレビルと BNPP を併用すると、TFV-DP の生成に対する阻害は、テラプレビル単剤添加時の 3.7 倍となった。

図 2.6.2- 3　HepAD38 細胞でのTAF（0.5 µmol/L）の代謝に対する
CatA及びCES1 阻害剤の影響



BNPP = bis-p-nitrophenyl phosphate; TAF = tenofovir alafenamide; TFV = tenofovir; TFV-MP = tenofovir monophosphate; TFV-DP = tenofovir diphosphate; CatA = cathepsin A; CES1 = carboxylesterase 1
HepAD38 cells continuously incubated with 0.5 µM TAF for 24 hours in the presence of inhibitors.
Data represent mean from a single experiment performed in duplicate.
Source: Report PC-320-2006.

上記の結果から、CatA は肝細胞株における TAF の主な加水分解酵素であり、CES1 の寄与は中程度であることが示された。TAF の代謝における CatA 及び CES1 の寄与の程度は HepAD38 とヒト初代肝細胞（本項 2.1.2.1 章）［5］とで異なるものの、両酵素とも両細胞での TAF の加水分解に寄与している。

2.1.2.3　ヒト初代リンパ球系細胞でのTAF活性化

PBMC及びその他のリンパ組織においてTAFの細胞内活性化の初期段階を担う主な加水分解酵素は、リソソームのセリンプロテアーゼであるCatAであることが確認された［12、13］。更に、TAFの代謝効率は対照細胞と比較してCatA欠損線維芽細胞で低下すること［12］、また HeLa細胞において低分子干渉RNA（siRNA）によりCatAをノックダウンするとTAF代謝物の細胞内蓄積が減少することが示された［16］。

2.1.2.4　各種プロテアーゼ阻害剤存在下でのTAF活性化

（試験番号 PC-120-2001、添付資料番号 4.2.1.1.2、評価資料）

いくつかのウイルス PI は CatA の強力な阻害剤であることが示されているため［15］、精製 CatA を用いた加水分解酵素活性試験で、TAF と PI の薬物相互作用の可能性を評価した（試験番号 PC-120-2001）［16］。

HIV PI であるダルナビル、アタザナビル（ATV）、ロピナビル（LPV）及びリトナビル並びに薬物動態学的増強因子（ブースター）である COBI は、各薬剤の臨床における血漿中最高濃度

（C_{max}）を十分に上回る 50 µmol/L までの濃度で、CatA による TAF の加水分解を阻害しなかった（表 2.6.2- 3）。同様に、TMC-435、BI-201355、MK-5172、GS-9256 及び GS-9451 などの HCV PI の多くも、臨床での C_{max} を超える濃度で CatA に対する阻害をほとんど示さなかった。一方、共有結合性 HCV PI であるテラプレビル及び boceprevir は、CatA による TAF の加水分解を強力に阻害することが確認されており、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.3 及び 0.2 µmol/L であった。血漿タンパク結合率で補正すると、上記 IC_{50} 値は患者で認められる C_{max} の 1/5～1/7 となる。

以上より、検討した全ての HIV PI 及びほとんどの HCV PI は、TAF の細胞内活性化を阻害する可能性が極めて低いことが示された。これらのデータから、テラプレビル及び boceprevir を除く上記の PI と TAF との併用投与は TFV への細胞内変換に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

表 2.6.2- 3　CatAによるTAF（10 µmol/L）の加水分解に対する COBI、HIV-1 PI及びHCV PIの影響

Compound	IC_{50} ± SD (µmol/L)[a]	C_{max} (µmol/L) Total Drug	C_{max} (µmol/L)[b] Free Fraction
COBI or HIV-1 PIs			
DRV	> 50	8.9	1.6
ATV	> 50	6.3	0.7
LPV	> 50	15.2	0.3
RTV	> 50	1.3	0.02
COBI	> 50	2.2	0.2
HCV PIs			
Telaprevir	0.3 ± 0.17	5.2	1.5
Boceprevir	0.2 ± 0.02	3.3	1.3
TMC-435	> 50	13.3	< 0.002
BI-201335	25 ± 7	20	0.08
MK-5172	50	2.5	0.06
GS-9256	> 50	10.5	0.004
GS-9451	50	1.7	0.04

ATV = atazanavir; COBI = cobicistat; DRV = darunavir; HCV = hepatitis C virus; HIV-1 = human immunodeficiency virus type 1; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; LPV = lopinavir; PI = protease inhibitor; RTV = ritonavir; SD = standard deviation; TAF = tenofovir alafenamide; CatA = cathepsin A
a　Data represent mean ± SD values from at least 2 independent experiments
b　Concentration of free drug at C_{max} based on serum protein binding as determined by Gilead Sciences.
Source: Report PC-120-2001, [16]

2.1.3　TAFの*in vitro*ローディング

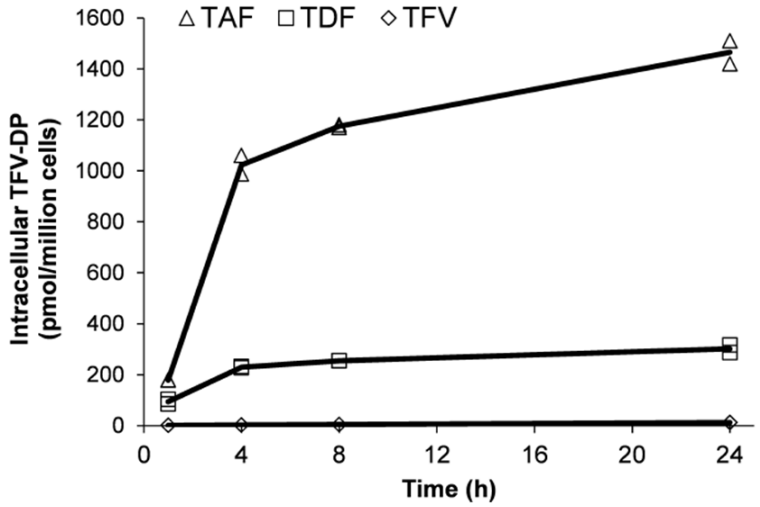
2.1.3.1　ヒト初代肝細胞でのTAFローディング

（試験番号 AD-120-2017、添付資料番号 4.2.2.4.6、評価資料）

ヒト初代肝細胞における TAF の代謝を TDF 及び TFV と比較検討するため、各薬剤添加後の細胞内 TFV-DP 濃度を LC/MS/MS により測定した（試験番号 AD-120-2017）［5］。その経時推移か

ら、TAF、TDF 及び TFV の活性代謝物 TFV-DP は各薬剤添加 24 時間後まで増加した。5 µmol/L の TFV、TDF 又は TAF との 24 時間インキュベーション後の TFV-DP 濃度は、それぞれ 12.1、302 及び 1470 pmol/10^6 cells であった（図 2.6.2- 4）。以上の結果から、TAF との 24 時間インキュベーション後の細胞内 TFV-DP 濃度は、TFV 及び TDF の場合と比較してそれぞれ約 120 倍及び約 5 倍高くなることが示された。

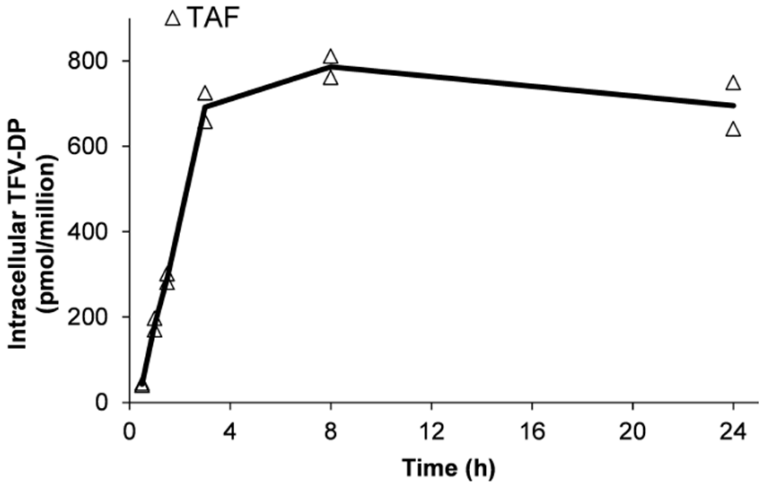
図 2.6.2- 4　ヒト初代肝細胞でのTAF（5 µmol/L）ローディングにおける細胞内TFV-DP濃度推移（24 時間インキュベーション）



TAF = tenofovir alafenamide; TDF = tenofovir disoproxil fumarate; TFV = tenofovir; TFV-DP = tenofovir diphosphate
All the data from the duplicate determinations at each time point were plotted, and the lines were drawn based on the mean values.
Source: Report AD-120-2017, [5]

ヒト初代肝細胞におけるTAFローディング後のTFV-DPの残存性を評価するため、TAF（5 µmol/L）との 2 時間パルスインキュベーション後、薬物を含まない培地で 22 時間ウォッシュアウトしたときのTAFローディングを評価した［5］。図 2.6.2- 5 に示すように、TFV-DP濃度は 3 時間で約 700 pmol/10^6 cellsに達し、24 時間の経過中にほとんど減少しなかった。別の試験で、ヒト初代肝細胞をTFVとインキュベート後、さらに遅い時点まで評価を行ったところ、TFV-DPの $t_{1/2}$ は約 95 時間であり、1 日 1 回投与が裏付けられた［3］。以上の結果は、HepG2 細胞をTFVと短時間インキュベートした後、抗HBV活性が 24 時間以上持続したことと相関する［17］。

図 2.6.2- 5　ヒト初代肝細胞でのTAF（5 μmol/L）ローディングにおける
細胞内TFV-DP濃度推移（2 時間パルスインキュベーション後 22 時間ウォッシュアウト）



TAF = tenofovir alafenamide; TFV-DP = tenofovir diphosphate
All the data from the duplicate determinations at each time point were plotted, and the lines were drawn based on the mean values.
Source: [5]

2.1.3.2　　ヒト初代末梢血単核球でのTAF（及びTFV）ローディング

（試験番号 PC-120-2008、添付資料番号 4.2.1.1.3、評価資料）

単剤 10 日間反復投与試験である第 I 相試験 GS-US-120-0104 において、TAF 25 mg を 1 日 1 回投与したところ、TDF 300 mg 投与時に比べて血漿中 TFV 濃度は約 90%低く、PBMC 中 TFV-DP 濃度は約 5 倍高かった。TAF 25 mg を 1 日 1 回投与した被験者での PBMC 中 TFV-DP 濃度は、10 日目の投与前の時点で平均 0.677 μmol/L に達し、投与後 12 時間までわずかに上昇して 1.493 μmol/L となった。定常状態における TAF の平均血漿中 C_{max} は 0.469 μmol/L であった。

PBMC における TAF ローディング試験を実施し、*in vivo* と同等の TFV-DP 濃度が得られる TAF 濃度を測定した（試験番号 PC-120-2008）。TAF 曝露条件は、48 時間連続インキュベーション又は 2 時間パルスインキュベーション+ウォッシュアウトとした。連続インキュベーションを比較対照として評価し、2 時間パルスインキュベーション+ウォッシュアウトは、臨床試験 GS-US-120-0104（2.7.2.2.3.1.1 項）［11］の定常状態で観察された *in vivo* における限定的な血漿中 TAF 曝露（t_{max} = 0.38～0.50 時間、$t_{1/2}$ = 0.34～0.43 時間）を最もよく模倣した条件として評価した。インキュベーション開始後 6、24 及び 48 時間時点での TFV-DP 濃度を LC/MS/MS によって測定した。

連続インキュベーション及び 2 時間パルスインキュベーションのいずれの条件下でも TFV-DP 濃度と TAF 濃度は比例することが示された（表 2.6.2- 4）。TAF 13.7～124 nmol/L での 6 時間連続インキュベーション後、TFV-DP はターゲット濃度である 0.677～1.493 μmol/L に達した。2 時間パルスインキュベーション+ウォッシュアウトでは、TAF 124～370 nmol/L で TFV-DP はターゲット濃度 0.677～1.493 μmol/L に達した。この TAF 濃度は、臨床試験 GS-US-120-0104（2.7.2.2.3.1.1 項）［11］で観察された定常状態での平均血漿中 C_{max} 0.469 μmol/L を反映している。

表 2.6.2- 4　PBMCでのTAFローディングにおける細胞内TFV-DP濃度

TAF (nmol/L)	TFV-DP Concentration (µmol/L)					
	Continuous Incubation			2-Hour Pulse Incubation		
	6 hours	24 hours	48 hours	6 hours	24 hours	48 hours
13.7	0.55	1.18	2.12	BLQ	BLQ	BLQ
41.2	0.82	3.35	6.00	BLQ	BLQ	BLQ
124	2.89	10.3	19.4	BLQ	BLQ	BLQ
370	5.93	25.4	49.9	1.89	1.35	0.95
1111	20.2	69.0	128	7.05	4.01	3.17
3333	59.5	204	357	19.9	13.5	7.03
10000	176	453	840	73.5	46.7	24.5

BLQ = below limit of quantitation (limit of TFV-DP quantitation: 0.5 µmol/L); TAF = tenofovir alafenamide; TFV-DP = tenofovir diphosphate; PBMC = peripheral blood mononuclear cell
Formation of TFV-DP in PBMCs was determined by LC/MS/MS. Data are mean values performed in duplicate.
Source: Report PC-120-2008

別の試験では、静止状態及びフィトヘマグルチニン（PHA）で刺激したヒト PBMC において、TFV 10 µmol/L と 24 時間インキュベーションし、薬物除去後の複数の時点における TFV-DP（論文中では PMPApp と省略）濃度を HPLC によって評価した［9］。静止状態及び PHA 刺激 PBMC での TFV-DP の $t_{1/2}$ はそれぞれ約 49 時間及び約 11 時間であった。

2.1.3.3　ヒト初代CD4$^+$ T細胞サブセットでのTAFローディング

（試験番号 PC-120-2023、添付資料番号 4.2.1.1.4、評価資料）

ヒト初代 CD4$^+$ T 細胞サブセットに臨床濃度の TAF をローディングしたときの TFV-DP 濃度を評価した（試験番号 PC-120-2023）。健康ドナー3 例から全 CD4$^+$ T 細胞並びに CD3、CD4、CD45RA 及び CCR7 の発現に基づく 4 種類の CD4$^+$ T 細胞サブセット（ナイーブ、エフェクター、セントラルメモリー及びエフェクターメモリー）を細胞選別法によって分離した。PBMC で得られたデータに基づき（本項 2.1.3.2 章）、CD4$^+$ T 細胞サブセットと TAF 400 nmol/L のパルスインキュベーション 2 時間後及び薬物を含まない培地でのウォッシュアウト 22 時間後（パルスインキュベーション開始から 24 時間後）の細胞内 TFV-DP 濃度を LC/MS/MS により測定した。

同じドナーから得られた各 CD4$^+$ T 細胞サブセットにおいて、全 CD4$^+$ T 細胞と同程度の細胞内 TFV-DP 濃度が得られた。ドナー間のばらつきはわずかであった。いずれの CD4$^+$ T 細胞サブセットにおいても、ウォッシュアウト 22 時間後の平均 TFV-DP 濃度は、パルスインキュベーション 2 時間後のそれと同程度であった。またセントラルメモリーサブセットでは、ウォッシュアウト 22 時間後の TFV-DP 濃度が高くなる傾向が認められた（表 2.6.2- 5）。

以上の結果から、評価した全ての $CD4^+$ T 細胞サブセットにおける TFV-DP の細胞内半減期は、いずれも長いことが示された。これは臨床試験 GS-US-120-0104 で TAF 25 mg を 1 日 1 回投与した被験者から得られた PBMC における TFV-DP の半減期と一致する（2.7.2.2.3.1.1 項）［11］。

表 2.6.2- 5　$CD4^+$ T細胞サブセットでのTAF（400 nmol/L）ローディングにおける細胞内TFV-DP濃度

	TFV-DP Concentration (µmol/L)		
	2-Hour Pulse Incubation with 400 nmol/L TAF		
$CD4^+$ T Cell Population	2 hours	24 hours	24 hour/2 hour Ratio
Total	1.68	1.96	1.1
Naïve	1.01	1.35	1.3
Effector	1.21	1.66	1.3
Central Memory	1.82	3.25	1.7
Effector Memory	2.12	2.92	1.3

TAF = tenofovir alafenamide; TFV-DP = tenofovir diphosphate
Formation of TFV-DP in $CD4^+$ T cells was determined by LC/MS/MS. Data are mean values from 3 donors performed in duplicate.
Source: Report PC-120-2023

2.1.3.4　　ヒト初代骨芽細胞でのTAFローディング

（試験番号 PC-120-2008、添付資料番号 4.2.1.1.3、評価資料）

PBMCでのTFV-DP濃度増加に加えて、イヌ組織分布試験において示唆されたように、TAFはTDFと比較して他の組織への分布も増大させる可能性がある［18］。HBV又はHIV-1 感染症の治療のためにTDF 300 mg 1 日 1 回投与を受けた患者において骨密度（BMD）低下が認められていることを考慮すると、特に重要な組織の 1 つが骨である［19、20］。そこで、ヒト初代骨芽細胞におけるTAFローディング試験を実施し、*in vivo*でのPBMC内濃度と同等のTFV-DP濃度が得られるTAF濃度を測定した（試験番号PC-120-2008）。PBMCにおいて得られたデータに基づき、ヒト初代骨芽細胞とTAFのパルスインキュベーション 2 時間後及び薬物を含まない培地でのウォッシュアウト 22 時間後（パルスインキュベーション開始から 24 時間後）の細胞内TFV-DP濃度をLC/MS/MSにより測定した。

表 2.6.2- 6 に示すように、パルスインキュベーション 2 時間後の TFV-DP 濃度は、全ての TAF 濃度で比例し、ウォッシュアウト 22 時間後では TAF 濃度 370～3333 nmol/L において比例した。ヒト初代骨芽細胞におけるパルスインキュベーション開始から 24 時間後の TFV-DP 濃度は、同じ TAF 濃度における PBMC 内濃度の約 1/3 であった（表 2.6.2- 4）。ヒト初代骨芽細胞において、TAF パルスインキュベーションを 3 日間行った場合、50 時間（3 回目のパルスインキュベーション 2 時間後）及び 72 時間（3 回目のパルスインキュベーション開始から 24 時間後）における TFV-DP 濃度は、1 回目のパルスインキュベーション 2 時間後と同程度であった。

以上より、ヒト初代骨芽細胞では、PBMC と比較して TAF の選択的な取り込みは認められなかった。この結果は、[^{14}C]-TAF を用いたイヌ組織分布試験と一致しており、同試験では骨における TAF 由来放射能は PBMC に比べて明らかに低値であることが示された［18］。

表 2.6.2- 6　ヒト初代骨芽細胞でのTAFローディングにおける細胞内TFV-DP濃度

	TFV-DP Concentration (µmol/L)	
	2-Hour Pulse Incubation with TAF	
TAF (nmol/L)	2 hours	24 hours
124	0.30	0.31
370	0.81	0.47
1111	1.92	1.39
3333	5.43	4.02
10000	18.8	9.69

TAF = tenofovir alafenamide; TFV-DP = tenofovir diphosphate
Formation of TFV-DP in primary human osteoblasts was determined by LC/MS/MS. Data are mean values performed in duplicate
Source: Report PC-120-2008

2.1.4　TAFの*in vivo*代謝

2.1.4.1　アカゲザルでのTAF（及びTFV）ローディング

（試験番号 P2000087、添付資料番号 4.2.2.2.9、評価資料）
（試験番号 P2001025、添付資料番号 4.2.1.1.7、評価資料）

アカゲザルに TAF（モノフマル酸塩）5.0 又は 50 mg/kg を単回経口投与したときの TAF 及び TFV の血漿中薬物動態プロファイル並びに PBMC における細胞内 TFV 濃度を検討した（試験番号 P2000087）。TAF（モノフマル酸塩）50 mg/kg 投与後、血漿中 TAF 及び TFV 濃度はそれぞれ t_{max} 0.5 及び 1 時間で速やかに上昇した。同じ個体での血漿中 TAF 及び TFV の $t_{1/2}$ はそれぞれ 0.40 及び 17.33 時間であった。PBMC での TFV 濃度は 96 時間まで維持され、明らかに血漿中よりも消失が遅かった（表 2.6.2- 7）。酸性ホスファターゼ処理したサンプルでは未処理サンプルに比べて TFV 濃度が明らかに高値であったことから、PBMC 内における TFV 関連物質の大部分は、リン酸化型であることが示唆された。

表 2.6.2- 7　アカゲザルにおけるTAF（モノフマル酸塩）単回経口投与後のPBMC内TFV濃度

TAF (monofumarate) Dose (mg/kg)	TFV Concentration (ng/10^6 Cells)					
	Single Oral Dose					
	Without Acid Phosphatase Treatment			With Acid Phosphatase Treatment		
	2 hours	24 hours	96 hours	2 hours	24 hours	96 hours
5	0.47	0.06	BLQ	0.73	0.62	0.18
50	17.0	6.82	3.03	34.2	20.1	8.68

BLQ = below limit of quantitation; TAF = tenofovir alafenamide; TFV = tenofovir; PBMC = peripheral blood mononuclear cell
Phosphorylated metabolites of TFV were converted to TFV by treatment with acid phosphatase for 30 min at 4°C. Data are mean values obtained from 6 (3/sex/group) rhesus monkeys.
Source: Report P2000087

別の試験において、[^{14}C]-TFV 15、30 及び 60 mg/kg をアカゲザルに単回皮下投与したときの TFV の血漿中薬物動態プロファイル並びに PBMC 及びリンパ節単核球（LMNC）における細胞内 TFV 代謝を検討した（試験番号 P2001025）。TFV 及び TFV-DP の濃度は HPLC で測定した。

In vitro 試験（本項 2.1.3.2 章）と同様に、*in vivo* でも TFV は PBMC に効率的に取り込まれ TFV-DP に代謝された。このとき、TFV-DP の細胞内濃度は最大で 0.897 µmol/L に達した（30 mg/kg 投与群）。PBMC での TFV-DP の $t_{1/2}$ は 48 時間を超えた。投与 48 時間後、腋窩、鼠径部及び腸間膜リンパ節から採取した LMNC でも十分な濃度の TFV 及びその代謝物が認められた（試験番号 P2001025）。

2.1.4.2　　イヌでのTAFローディング

（試験番号 AD-120-2034、添付資料番号 4.2.2.2.8、評価資料）
（試験番号 AD-120-2033、添付資料番号 4.2.2.2.10、評価資料）

ビーグル犬に TAF（モノフマル酸塩）10 mg/kg を単回経口投与後の血漿中及び肝臓中の PK プロファイルを検討した（試験番号 AD-120-2034）。TAF は速やかに吸収され、血漿中 TAF の t_{max} は 0.08 時間であった。その後、0.24 時間の $t_{1/2}$ で速やかに消失した。血漿中の主な代謝物は TFV であり、C_{max} は 2.23 µmol/L であった。肝臓中の主な代謝物は活性代謝物である TFV-DP であり、投与後 4.0 時間で C_{max} 126 µmol/L に達した。

別の試験で、ビーグル犬に TAF（ヘミフマル酸塩）遊離塩基換算（f.b.e.）で 8.29 mg f.b.e./kg を 1 日 1 回 7 日間経口投与した時の投与 1 及び 7 日目に血漿中 PK プロファイルを、また投与 7 日目に肝臓中 PK プロファイルを検討した（試験番号 AD-120-2033）。投与 1 日目及び 7 日目ともに、TAF は速やかに吸収され、その後 0.3 時間の $t_{1/2}$ で速やかに消失した。TAF の速やかな消失に伴い、TFV が増加した。血漿中の主な代謝物は TFV であり、投与 1 日目及び 7 日目の C_{max} は、それぞれ 1.47 及び 2.12 µmol/L であった。肝臓中の主な代謝物は TFV-DP で、投与 7 日目の投与 4 及び 24 時間後の濃度はそれぞれ 242 及び 153µmol/L であった。

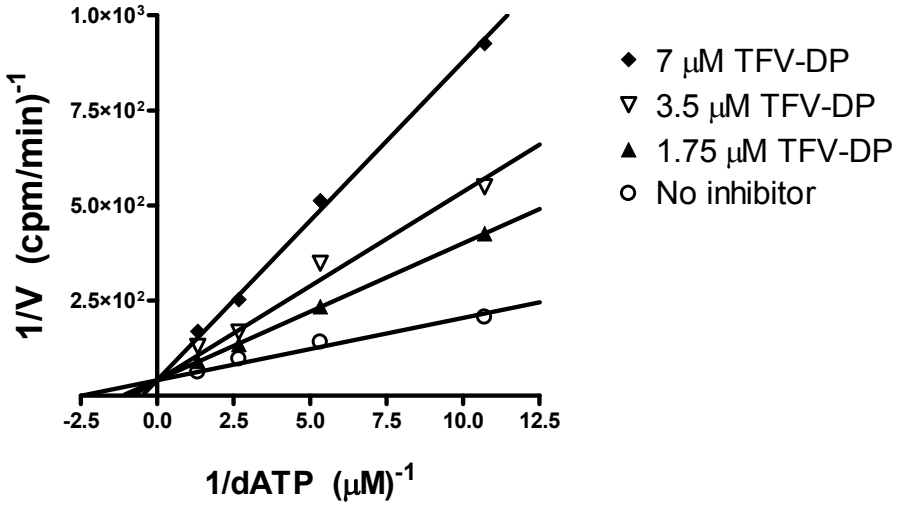
2.1.5　HBV（及び HIV-1）逆転写酵素の阻害

TAF の活性代謝物である TFV-DP は、3 位の水酸基が欠落した dATP アナログである。DNA 重合反応の際、TFV-DP は新生 DNA 鎖への取り込みに対して dATP と競合し、DNA 合成を停止させる［3、4］。TFV-DP は、哺乳類 DNA ポリメラーゼ α、β、δ、ε、及び mtDNA ポリメラーゼ γ に対する阻害作用は弱いが［4、21、22］、HBV RT や HIV-1 RT のようなウイルス DNA ポリメラーゼに対してはウイルス複製時に阻害活性を示すと考えられる。

HBV は *hepadnaviridae* 科に属し、HIV-1 は *retroviridae* 科に属する。HBV 及び HIV-1 はいずれも RT によって複製し、RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ（RDDP）、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ（DDDP）及びリボヌクレアーゼ（RNase）H の活性を必要とする。したがって、HBV と HIV-1 が相同性の高い RT をコードしているのは驚くべきことではない［23］。HBV RT には N 末端タンパク質ドメイン及びスペーサードメインが含まれ、N 末端タンパク質ドメインはウイルス DNA 合成のタンパク質プライミングに関与することから、HBV RT は、区別なく pol、RT 又は pol/RT とも表記する［24］。そのため、以下ではウイルスのポリメラーゼ又は RT に基づく活性を HBV pol/RT と略する。

バキュロウイルスに発現させ、精製した組換え型 HBV pol/RT を用いた酵素的分析において、HBV pol/RT の DDDP 活性に及ぼす TFV-DP の作用を評価した［3］。HBV pol/RT のポリメラーゼ活性は TFV-DP によって用量依存的に阻害されたが、最大反応速度（V_{max}）は変化しなかった（図 2.6.2- 6）。TFV-DP による DDDP 阻害の阻害定数（K_i）は 0.18 µmol/L であり、dATP のミカエリス定数（K_m）（0.38 µmol/L）［25］の 1/2.1 であった。

図 2.6.2- 6　TFV-DP による HBV pol/RT の DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性抑制作用



dATP = deoxyadenosine triphosphate; TFV-DP = tenofovir diphoshate; V = velocity; HBV = hepatitis B virus; DNA = deoxyribonucleic acid; pol = polymerase; RT = reverse transcriptase
After incubation of HBV pol/RT with activated calf thymus DNA and dNTPs, inhibition of α-^{33}P-labeled dATP incorporation was measured in the presence of indicated concentrations of TFV-DP. Data are presented as a Lineweaver-Burk plot.
Source: [3]

別の試験では、組換え型 HIV-1 RT を用いた酵素的分析において、HIV-1 RT の RDDP 活性及び DDDP 活性に及ぼす TFV-DP の作用を評価した［4］。HBV pol/RT と同様に、HIV-1 RT のポリメラーゼ活性は TFV-DP によって用量依存的に阻害されたが、V_{max} は変化しなかった。TFV-DP による RDDP 及び DDDP 阻害の K_i 値は、それぞれ 0.02 及び 1.6 μmol/L であった。

以上の結果から、TFV-DP は DNA へ取り込まれる際に dATP と競合することで HBV pol/RT 及び HIV-1 RT を阻害し、新生 DNA 鎖に TFV-DP が取り込まれると不完全なうちに DNA 合成が停止することが示唆される。

2.2　*In vitro*抗HBV活性

2.2.1　野生型HBV臨床分離株に対するTAFの活性

（試験番号 PC-320-2003、添付資料番号 4.2.1.1.5、評価資料）

HepG2 細胞において、ジェノタイプ A～H を代表する 11 株の野生型 HBV 臨床分離株に対する TAF の抗ウイルス活性を評価した（試験番号 PC-320-2003）。ジェノタイプ A～H に感染した未治療患者から、完全長ゲノム又は pol/RT 領域を増幅して発現ベクターをクローニングし、HepG2 細胞に形質移入した。TAF 存在下で 7 日間処理後、HBV DNA 中間体を抽出し、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応試験（PCR）で定量化して *in vitro* 感受性を評価した。

TAF は評価した全ての HBV ジェノタイプに対して強力な抗ウイルス活性を示した（表 2.6.2-8）。11 株の分離株に対する EC_{50} 値は 34.7～134.4 nmol/L の範囲であり、全株の平均 EC_{50} 値は 86.6 nmol/L であった。ジェノタイプ D 及び H は TAF に対して若干高い感受性を示したが、他の全てのジェノタイプの TAF EC_{50} 値は対照実験株 pHY92 と同程度であった。

表 2.6.2- 8　ジェノタイプA～Hの臨床分離株に対するTAFの抗ウイルス活性

Type	Genotype	Isolate ID	HBeAg Status	Cloned[a]	TAF	
					EC_{50} (nmol/L)[b]	EC_{50} FC from Control[c]
HBV	A	001	Negative	Full-length	112.0	1.1
	B	002	Negative	Full-length	109.3	1.1
	C	003	Positive	Full-length	107.5	1.1
		004	Positive	Full-length	64.6	0.6
	D	005	Negative	Full-length	70.5	0.7
		006	Negative	Full-length	62.8	0.6
	E	007	Negative	Full-length	134.4	1.3
	F	008	Negative	pol/RT	92.5	0.9
	G	009	Negative	pol/RT	120.4	1.2
		010	Negative	pol/RT	43.8	0.4
	H	011	Negative	pol/RT	34.7	0.3
	Control (A)	pHY92	n/a	Full-length	102.3	1.0

HBV = hepatitis B virus; HBeAg = HBV e antigen; n/a = not available; TAF = tenofovir alafenamide; pol = polymerase; RT = reverse transcriptase

a　Full-length genomes or pol/RT regions were amplified and cloned into an expression vector pHY106 or pRTAN (containing HBV genome of pHY92 except pol/RT), respectively, followed by transfection into HepG2 cells

b　Data represent the mean from a minimum of 2 independent experiments performed in quadruplicate.

c　Fold change (FC) in mean EC_{50} value relative to control (genotype A), pHY92.

Source: Report PC-320-2003

2.2.2　TAF（及びTFV）血清／血漿中タンパク結合率

（試験番号P0504-00039.1、添付資料番号 4.2.2.3.6、参考資料 *）

複数のヒト *ex vivo* 試験においてヒト血漿中の TAF のタンパク結合率は中程度であった。重度の腎機能障害患者（2.7.2.2.5.1.1 項）及び軽度から中程度の肝機能障害患者（2.7.2.2.5.1.2 項）での TAF 平均非結合型分率は 14%～23%の範囲であった。しかし、重度の肝機能障害患者（2.7.2.2.5.1.4 項）での TAF 平均非結合型分率は 37.8%であった。

ヒト血漿中及びヒト血清中における TFV の非結合型分率はそれぞれ 99.3%及び 92.8%であった（試験番号 P0504-00039.1）。

2.3　*In vivo*抗HBV活性

2.3.1　動物のヘパドナウイルスに対するTDFの活性

（試験番号PC-174-2004、添付資料番号 4.2.1.1.8、参考資料 †）

自然宿主であるイースタンウッドチャック（*Marmota monax*）でのWHVは、HBV感染モデルとしてよく用いられている。WHV感染ウッドチャックにTDFを 4 週間経口投与したときの抗ウイルス効果を評価した［26］。TDF（0.5、1.5、及び 5.0 mg/kg/日）投与終了時の血清中ウイルス量は、投与前値と比較してそれぞれ 0.2、1.1 及び 1.5 $\log_{10}$ copies/mL減少し、対照群と比較していずれも有意な減少であった（それぞれ$p < 0.01$、$p < 0.01$ 及び$p < 0.05$；Student's t test又はMann-Whitney U test）。TDF 15 mg/kg/日を 4 週間投与したとき、血清中ウイルス量は 1.2 $\log_{10}$ copies/mL減少したが、個体間変動が大きく統計学的に有意ではなかった。

別の試験では、TDF、ADV、ラミブジン（3TC）及びエムトリシタビン（FTC）の単剤（いずれも 15 mg/kg/日）並びに 2 剤併用［(ADV＋3TC、ADV＋FTC、TDF＋3TC、TDF＋FTC（いずれも 15＋15 mg/kg/日)］を WHV 感染ウッドチャックに 48 週間経口投与したときの抗ウイルス効果を評価した（試験番号 PC-174-2004)。投与 12 週目に、TDF を含む群（TDF 群、TDF＋3TC 群及び TDF＋FTC 群）の血清中ウイルス量は投与前値と比較して平均でそれぞれ 3.6 、3.7 及び 4.2 $\log_{10}$ copies/mL 減少した。投与 12～24 週目では、全ての薬物投与群で様々な程度のウイルスリバウンドが認められた。投与 48 週目では、TDF 群、3TC＋TDF 群及び FTC＋TDF 群での血清中ウイルス量は、平均でそれぞれ 2.9、5.8 及び 6.1 $\log_{10}$ copies/mL 減少した。48 週間の全投与期間において、いずれの薬物（単剤及び併用）を投与したウッドチャックにおいても、毒性所見は認められなかった。

* : テノゼット錠®300mg 承認審査時に試験番号 95-DDM-XXXX-001 として提出済み
† : テノゼット錠®300mg 承認審査時に提出済み

2.4　*In vitro*選択性指数

2.4.1　TAFの抗HBV活性及び細胞毒性

（試験番号 PC-320-2003、添付資料番号 4.2.1.1.5、評価資料）
（試験番号 PC-120-2007、添付資料番号 4.2.1.2.2、評価資料）

HepG2 細胞を用いて、TAF の HBV に対する *in vitro* 抗ウイルス活性（EC_{50} 値）及び細胞毒性（50%細胞毒性濃度：CC_{50} 値）を評価した（試験番号 PC-320-2003 及び PC-120-2007）。TAF は、検討したすべての HBV ジェノタイプ（A～H）に対して強力な抗ウイルス活性を示し、全体での平均 EC_{50} 値は 86.6 nmol/L であった。さらに、TAF は、検討した最高濃度（44400 nmol/L）まで、細胞毒性を示さなかった。

以上の結果から、HepG2 細胞における TAF の選択性指数（SI 値）は 513 を超えることが示唆された（表 2.6.2- 9）。

表 2.6.2- 9　HepG2 細胞におけるTAFの抗HBV活性及び細胞毒性

	Cells/Virus		
	$HepG2/HBV_{A-H}$		
Drug	**EC_{50} (nmol/L)[a]**	**CC_{50} (nmol/L)**	**SI[b]**
TAF	86.6	>44400	>513

CC_{50} = concentration that resulted in 50% cytotoxicity; EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; SI = selectivity index; TAF = tenofovir alafenamide; HBV = hepatitis B virus
a　EC_{50} for TAF is mean of EC_{50} value for 11 wild-type clinical HBV isolates representing genotypes A to H.
b　Ratio of CC_{50} to EC_{50}.
Source: Reports PC-320-2003 and PC-120-2007

2.5　*In vitro* HBV耐性

TDFによるHBV感染患者への治療は、ウイルス複製の抑制及び炎症活性の低減に有効であることが示されている。2 つの第 3 相試験において、TDF治療下でウイルス複製が検出された被験者のウイルス分離株から得られたHBV pol/RTにおける遺伝子型変化を同定するため、ウイルス学的分析を実施した。6 年を超える耐性調査後、TDFに対する遺伝子型耐性又は表現型耐性は確認されていない［27］。

従来から用いられているHBV感染細胞を用いた耐性発現試験において、TAF、TDF及びTFVの非臨床耐性プロファイルを検討する予定であった。しかし、HBV複製サイクルを評価する様々なモデルがあるにもかかわらず、ヒト初代肝細胞ではウイルス感染が短期間しか維持されず、また肝細胞株では受容体が発現していないために感染しない［28］。このようにウイルスが持続的に増殖可能な安定した組織培養試験系が確立していないため、予定していたTAFに対する*in vitro*耐性発現試験は実施しなかった。

2.6　薬剤耐性変異株に対する*in vitro*抗HBV活性

2.6.1　ヌクレオシ（チ）ド耐性変異導入HBV分離株に対するTAFの活性

（試験番号 PC-320-2007、添付資料番号 4.2.1.1.6、評価資料）

ADV［29］、LAM［30］、ETV［31］及びテルビブジン（TBV）［32］は、HBVにおけるNRTIに対する耐性変異が同定されているが、TDFについては、最長 6 年までの投与において、耐性は検出されていない［27］。TFVは、*in vitro*で、LAM、ETV、及びTBV耐性（-R）変異株に対して強力な抗HBV活性を示すことが明らかになっている。一方、*in vitro* でADV-R変異株に対しては低度にTFVの抗HBV活性が抑制されるが、それでもTFVはADV使用経験のあるほとんどの患者に対して有効である［33、34、35、36、37］。

NRTI-R 変異を含む HBV に対する TAF の抗ウイルス活性を評価するため、部位特異的変異導入法により完全長 HBV 臨床分離株に 11 種の薬剤耐性変異を導入した（試験番号 PC-320-2007）。ADV-R（n=5）、LAM-R（n=3）及び ETV-R（n=3）変異を含むコンストラクトを HepG2 細胞に導入し、7 日間 TAF 処理後の *in vitro* 感受性を評価した。

TAF は全ての LAM-R（3/3 株）及び ETV-R（3/3 株）変異体並びにほとんどの ADV-R（4/5 株）変異体に対して強力な抗 HBV 活性を示し、EC_{50} FC は野生型と比較して 2.0 倍未満であった（表 2.6.2- 10）。1 つの ADV-R 組換え体（rtA181V + rtN236T）では、野生型と比較してわずかな TAF に対する感受性の低下（3.7 倍）が認められた。

一連の変異体の TAF に対する感受性変化は、若干のばらつきはあるが TFV と類似していた。また、全ての LAM-R 及び ETV-R 変異体では、LAM（>48.8 倍）及び ETV（>28.6 倍）に対する感受性がそれぞれ有意に低下した。

表 2.6.2- 10　ヌクレオシ（チ）ド耐性変異導入HBV分離株のTAFに対する感受性

Type	RT Mutation(s)[a, b]	EC_{50} FC from WT Control[c, d]			
		TAF	TFV	LAM	ETV
WT	n/a	1.0	1.0	1.0	1.0
ADV-R	rtA181T[e]	1.7	0.9	−	−
	rtA181T[f]	1.1	0.6	−	−
	rtA181V	1.2	1.0	−	−
	rtN236T	1.4	0.6	−	−
	rtA181V + rtN236T	3.7	2.8	−	−
LAM-R	rtM204I	1.6	1.8	>48.8	−
	rtL180M + rtM204V	1.8	1.5	>48.8	−
	rtV173L + rtL180M + rtM204V	0.9	1.6	>48.8	−
ETV-R	rtL180M + rtM204V + rtT184G	1.7	1.2	−	>28.6
	rtL180M + rtM204V + rtS202G	1.5	0.9	−	>28.6
	rtL180M + rtM204V + rtM250V	1.2	1.5	−	>28.6

ADV = adefovir pivoxil; ETV = entecavir; LAM = lamivudine; n/a = not applicable; -R = resistant; RT = reverse transcriptase;
TAF = tenofovir alafenamide; TFV = tenofovir; WT = wild-type; − = not tested; HBV = hepatitis B virus
a　RT domain-specific amino acid position numbering for HBV polymerase [38]
b　Site-directed recombinants introduced into WT control (genotype D), followed by transfection into HepG2 cells
c　Fold change (FC) in mean EC_{50} value relative to WT control (genotype D). EC_{50} data averaged from at least 2 independent experiments performed in quadruplicate.
d　Mean EC_{50} values against WT control for TAF, TFV, LAM, and ETV were 99.1 nmol/L, 14.4 μmol/L, 4.1 μmol/L, and 17.5 nmol/L, respectively
e　rtA181T mutation resulted in a W172* stop codon mutation in HBsAg
f　rtA181T mutation resulted in a W172L mutation in HBsAg
Source: Report PC-320-2007

3　副次的薬理試験

3.1　オフターゲット阻害の*in vitro*評価

3.1.1　細胞内DNAポリメラーゼに及ぼすTFV-DPの影響

本章 2.1.2 項に記載したとおり、TAF は標的細胞中で加水分解されて TFV となり、その結果、生体内で TFV-DP の細胞内濃度が高くなる（2.7.2.2.3.1.1 項）［5、11］。TFV-DP のほ乳類 DNA ポリメラーゼに対する特異性を、ウイルスポリメラーゼとの相互作用と比較して評価した。

ヒトDNAポリメラーゼα、β及びγ、並びにラットDNAポリメラーゼδ及びεによって媒介されるDNA合成に及ぼすTFV-DPの阻害作用を表 2.6.2-11 に要約した［4、21］。TFV-DPのDNAポリメラーゼに対する作用は、TFV-DPのKi値と天然基質dATPのKm値との比（即ちKi/Km）で示した。mtDNAポリメラーゼγに対するKi/Km比は極めて大きく（85.0）、TFVがmtDNA合成に干渉する可能性が低いことが示唆された［4］。追加試験では、1 mmol/LのTFV-DPはSV40 DNAの*in vitro*複製にほとんど影響を及ぼさなかったことから、宿主DNA複製複合体と比較してウイルスRTに対して顕著な選択性を有することが示されている［39］。TFV-DPはHBV pol/RT及びHIV-1RTに対する選択性を示し、ほ乳類DNAポリメラーゼに対するKi/Km比は、HBV pol/RT及びHIV-1RTに対する値のそれぞれ 4~180 倍及び 5~240 倍高かった［4、21、3］。

表 2.6.2-11　ヒトDNAポリメラーゼ（α、β及びγ）及びラットDNAポリメラーゼ（δ及びε）並びにウイルスRTに対するTFV-DPのKi/Km比

Enzyme	K_i (µmol/L)	K_m dATP (µmol/L)	K_i/K_m
Human DNA pol α	5.2	2.7	1.93
Human DNA pol β	81.7	5.6	14.6
Human DNA pol γ	59.5	0.7	85.0
Rat DNA pol δ / PCNA	7.1	0.7	10.2
Rat DNA pol ε	95.2	6.1	15.6
HBV pol/RT	0.18	0.38	0.47
HIV-1 RT	1.6	4.6	0.35

DNA = deoxyribonucleic acid; HIV-1 = human immunodeficiency virus type 1; PCNA = proliferating cell nuclear antigen; pol = polymerase; RT = reverse transcriptase
Data from references: [4, 21, 3]

TFV-DPが宿主ポリメラーゼの基質となる可能性を評価するため、内在性 2'-デオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）と比較したヒトDNAポリメラーゼα、β及びγによるDNAプライマー／テンプレートへの取り込み効率を求め、他のNRTI-三リン酸（TP）と比較した［40］。DNAポリメラーゼα及びβによるTFV-DPの取り込みは、ジデオキシアデノシン-TP［ddATP：ジダノシン（ddI）の活性代謝物］、ジデオキシシチジン-TP［ddCTP：ザルシタビン（ddC）の活性代謝物］、3TC-TP及びスタブジン（d4T）-TPと比較して、同等又は低かった（表 2.6.2-12）。重要な知見として、DNAポリメラーゼγがTFV-DPをDNAプライマー／テンプレートに取り込む効率は、天然基質と

比較して極めて低い（0.06%）。この結果は、前述の阻害試験で得られた、TFV-DPが宿主ポリメラーゼを阻害する可能性は低いとの結論を確認するものである。

表 2.6.2-12　ヒトDNAポリメラーゼ（α、β及びγ）による
TFV-DP及びNRTI-TPのDNA取り込み効率

dNTP Analog	Relative Efficiency of Incorporation (%)[a]		
	Pol α	Pol β	Pol γ
TFV-DP	1.4	1.3	0.06
ddATP	0.25	80	20
ddCTP	0.1	125	25
3TC-TP	0.05	9.0	0.13
d4T-TP	6.3	142	8.0

TFV-DP = tenofovir diphosphate; ddATP = dideoxyadenosine triphosphate, active metabolite of ddI (didanosine); ddCTP = dideoxycytidine triphosphate; ddC = zalcitabine; 3TC-TP = lamivudine triphosphate; d4T-TP = stavudine triphosphate dNTP = 2'-deoxynucleoside triphosphates; DNA = deoxyribonucleic acid; NRTI-TP = nucleoside reverse transcriptase inhibitor triphosphate; pol = polymerase
a　Relative efficiency of incorporation (%) = 100 × [V_{max}(dNTP analog)/K_m(dNTP analog)]/[V_{max}(dNTP)/K_m(dNTP)].
Data from reference: [40]

3.1.2　レセプター結合能に及ぼすTDF及びTFVの影響

（試験番号 V2000020、添付資料番号 4.2.1.2.15、評価資料）

一連の 111 の標的タンパク質（神経受容体、イオンチャネル、トランスポーター、核内受容体）に対する TDF 及び TFV の阻害／活性化作用を評価した（試験番号 V2000020）。標的タンパク質を 10 µmol/L の TFV 又は TDF の存在下でインキュベートし、内因性リガンドの結合に及ぼす影響を確認した。50%を超える阻害／活性化作用を有意な作用とした。TFV 及び TDF はいずれも標的タンパク質の結合に対して有意な阻害／活性化作用を示さなかった。以上より、TFV 及び TDF はいずれも検討した 111 の標的タンパク質と有意な相互作用を示さないことが確認された。

3.2　*In vitro*細胞毒性

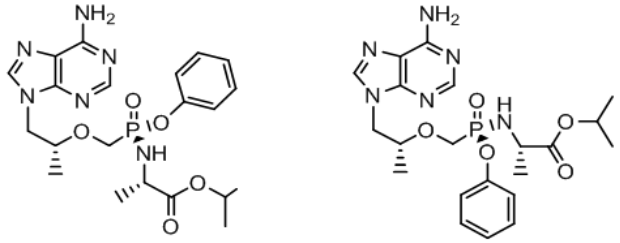
3.2.1　ヒト初代末梢血単核球（PBMC）及び骨格筋細胞（SkMC）に対する細胞毒性

（試験番号 PC-120-2009、添付資料番号 4.2.1.2.1、評価資料）
（試験番号 P4331-00037、添付資料番号 4.2.1.2.16、評価資料）

分裂期及び静止期のヒト PBMC を TAF、そのジアステレオマーである GS-7339（図 2.6.2- 7）、TDF 及び TFV と 5 日間連続インキュベートしたときの CC_{50} 値を評価した（試験番号 PC-120-2009）。単剤反復投与試験である第 I 相試験で観察された C_{max}、T_{max}及び $t_{1/2}$ から、TAF が循環血中で有意な濃度で存在するのは 2 時間未満であることが明らかであったため（2.7.2.2.3.1.1 項）［11］、本試験で用いた TAF の濃度は治療域の濃度及び持続時間を上回っていた。分裂期及び静

止期の PBMC における TAF の CC_{50} 値はそれぞれ 6.8 及び 25.1 µmol/L であった（表 2.6.2-13）。TAF よりも GS-7339 の CC_{50} 値が高かったことから、GS-7339 の細胞毒性はより低いことが示唆された。このことは GS-7339 から TFV-DP への変換が限定的であることからも裏付けられる［18］。全体として、分裂期及び静止期の PBMC における TAF の毒性プロファイルは良好であった。

図 2.6.2- 7　TAF及びそのジアステレオマーGS-7339 の構造式



Source: Report PC-120-2009

表 2.6.2-13　分裂期及び静止期ヒトPBMCに対する
TAF、GS-7339、TDF及びTFVの*in vitro*細胞毒性

Class	Drug	Cytotoxicity CC_{50} (µmol/L)[a]	
		Resting PBMCs	Dividing PBMCs
NtRTI	TAF	25.1 ± 11.5	6.8 ± 1.8
	GS-7339	> 124.6	> 186.2
	TDF	69.7 ± 22.1	19.6 ± 5.2
	TFV	> 2652	2150 ± 532

CC_{50} = drug concentration that results in a 50% reduction in cell viability; NtRTI = nucleotide reverse transcriptase inhibitor; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; TAF = tenofovir alafenamide; TDF = tenofovir disoproxil fumarate; TFV = tenofovir
a　Mean ± SD values from PBMCs isolated from up to 9 donors.
Source: Report PC-120-2009

筋ミオパチーや乳酸アシドーシスなど、NRTIの使用に伴う有害事象は主に骨格筋組織に対する薬物の影響により生じるため、ヒト骨格筋細胞（SkMC）に対するTFVの*in vitro*細胞毒性を確認し、既存のNRTIと直接比較した（試験番号P4331-00037）［41］。薬物存在下で細胞を 6 日間培養した時、TFVは弱い細胞傷害作用を示し、そのCC50値は 870 µmol/Lであった。ddI及び 3TCもTFVと同程度の弱い細胞傷害作用を示した（CC_{50} 値はそれぞれ 846 及び 1230 µmol/L）。一方、ZDV、ddC、d4T及びアバカビル（ABC）は、SkMCに対してより低いCC_{50}値（66～497 µmol/L）を示した。

3.2.2　肝細胞株及びTリンパ芽球様細胞株における細胞毒性

（試験番号 PC-120-2007、添付資料番号 4.2.1.2.2、評価資料）
（試験番号 PC-120-2021、添付資料番号 4.2.1.2.3、評価資料）

NRTI の使用に伴う脂肪肝などの有害症状は、主に肝組織に対する薬物の影響により生じる。そこで、肝細胞株（HepG2）に対する TAF、TDF 及び TFV の CC_{50} 値を確認し、既存のレトロウイルス阻害剤と直接比較した（試験番号 PC-120-2007）。薬物存在下で細胞を 5 日間培養した時、TAF は最高濃度（44.4 µmol/L）まで HepG2 細胞に対して細胞毒性を示さなかった（表 2.6.2-14）。TAF の HepG2 細胞に対する細胞毒性プロファイルは、既存のレトロウイルス阻害剤と同様であった。

MT-2 細胞及び MT-4 細胞を用いて、5 日間培養後の TAF、TDF 及び TFV 及び一連の既存レトロウイルス阻害剤の CC_{50} 値も評価した（試験番号 PC-120-2007）。TAF は MT-2 細胞に対して最高濃度（53 µmol/L）まで細胞毒性を示さなかった。MT-4 細胞及び MT-2 細胞に対する TAF の CC_{50} 値はそれぞれ 23.2 及び>53.0 µmol/L であった（表 2.6.2-14）。概して TAF の細胞毒性は弱く、T 細胞に対する細胞毒性プロファイルはその他既存のレトロウイルス阻害剤と同様であった。

表 2.6.2-14　肝細胞株及びTリンパ芽球様細胞株に対する
TAF及び既存のHIV阻害剤の*in vitro*細胞毒性

Class	Drug	Cytotoxicity CC_{50}, µmol/L (MSD)[a]		
		Hepatic	T Lymphoblastoid	
		HepG2	MT-2	MT-4
NtRTI	TAF	>44.4 (1)	>53.0 (1)	23.2 (1.13)
	TDF	>44.4 (1)	37.1 (1.02)	22.9 (1.04)
	TFV	>44.4 (1)	7605 (1.06)	6264 (1.13)
NRTI	FTC	>44.4 (1)	>53.0 (1)	>53.0 (1)
	3TC	>44.4 (1)	>53.0 (1)	>53.0 (1)
	ABC	>44.4 (1)	40.7 (1.02)	>53.0 (1)
	ZDV	>44.4 (1)	>53.0 (1)	>53.0 (1)
	ddI	>44.4 (1)	>53.0 (1)	>53.0 (1)
	ddC	>44.4 (1)	>53.0 (1)	>53.0 (1)
NNRTI	EFV	10.1 (1.05)	25.4 (1.03)	26.4 (1.04)
INSTI	RAL	>44.4 (1)	>53.0 (1)	>53.0 (1)
PI	ATV	>44.4 (1)	>53.0 (1)	>53.0 (1)
Control	PUR[b]	1.0 (1.12)	0.4 (1.05)	0.2 (1.06)

3TC = lamivudine; ABC = abacavir; ATV = atazanavir; CC_{50} = drug concentration that results in a 50% reduction in cell viability; ddC = zalcitabine; ddI = didanosine; EFV = efavirenz; FTC = emtricitabine; INSTI = integrase strand transfer inhibitor; NNRTI = nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI = nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NtRTI = nucleotide reverse transcriptase inhibitor; PI = protease inhibitor; RAL = raltegravir; TAF = tenofovir alafenamide; TDF = tenofovir disoproxil fumarate; TFV = tenofovir; ZDV = zidovudine; HIV = human immunodeficiency virus
a　All cells were treated for 5 days. Cytotoxicity CC_{50} values represent geometric of independent experiments (n=3) generated using 384-well assays. Multiplicative standard deviations (MSD) are shown in parenthesis.
b　Puromycin (PUR) was used as a positive control in cytotoxicity assays.
Source: Report PC-120-2007

5 日間培養後の MT-2 細胞及び MT-4 細胞を用いて、TAF 代謝物である M18（GS-645552）及び M28（GS-652829）の細胞毒性及び抗ウイルス活性を評価した（試験番号 PC-120-2021）。これらの代謝物は分解物でもあるため、同評価は製造作業の安全性をサポートするものであった。TAF の両代謝物は、最高濃度（57 µmol/L）まで細胞毒性を示さなかった。

3.2.3　ヒト骨髄前駆細胞及び赤血球前駆細胞における造血毒性

（試験番号 PC-120-2016、添付資料番号 4.2.1.2.4、評価資料）

3 例のドナーから採取した骨髄を用いて、TAF のヒト赤血球前駆細胞及び骨髄前駆細胞に対する細胞傷害作用を評価した（試験番号 PC-120-2016）。TAF の曝露条件は、14 日間連続インキュベーション又は 12 時間パルスインキュベーションとした。連続インキュベーションは対照として評価したが、ウォッシュアウトを含む 12 時間パルスインキュベーションは、臨床試験 GS-US-120-0104 で認められた定常状態での TAF の血漿中 C_{max} 平均値 0.469 µmol/L を大幅に上回る濃度

で、*in vivo* における限定的な TAF の血漿曝露（T_{max} = 0.38～0.50 時間、$t_{1/2}$ = 0.34～0.43 時間）をより正確に再現するために評価した（2.7.2.2.3.1.1 項）。

連続インキュベーションでは、ロット番号 BM07B21195 の骨髄から得た赤血球前駆細胞及び骨髄前駆細胞の増殖に対する TAF の IC_{50} 値はそれぞれ>3 µmol/L 及び 3.3 µmol/L（外挿）であった（表 2.6.2-15）。他の 2 ロットでも同様の結果が得られた。12 時間のパルスインキュベーションでは、赤血球前駆細胞及び骨髄前駆細胞の増殖に対する TAF の IC_{50} はいずれも>3 µmol/L であった。

概して連続インキュベーション又はパルスインキュベーション条件下における TAF の IC_{50} 値は、臨床での C_{max} の 7 倍以上であり、骨髄前駆細胞及び赤血球前駆細胞に対して良好な安全性プロファイルを有することが示唆された。

表 2.6.2-15　TAF及び 5-フルオロウラシルの*in vitro*造血毒性比較

Bone Marrow Lot	Continuous Incubation				12-Hour Pulse Incubation			
	Erythroid IC_{50} (µmol/L)		Myeloid IC_{50} (µmol/L)		Erythroid IC_{50} (µmol/L)		Myeloid IC_{50} (µmol/L)	
	TAF	5-FU	TAF	5-FU	TAF	5-FU	TAF	5-FU
BM07B21195	> 3	3.20	3.30[ex]	3.97	> 3	20.34	> 3	51.41
BM10A33225	> 3	3.89	3.92[ex]	2.49	> 3	118.80[ex]	> 3	91.15
BM10AOF3062	> 3	4.09	>3	1.06	> 3	69.43	> 3	67.05

TAF = tenofovir alafenamide; 5-FU = 5-fluorouracil; ex = extrapolated value; IC_{50} = 50% inhibitory concentration
Source: Report PC-120-2016

3.2.4　腎トランスポーター依存的細胞毒性

3.2.4.1　TAF（及びTFV）の腎トランスポーター依存的細胞毒性

（試験番号 PC-120-2018、添付資料番号 4.2.1.2.5、評価資料）

有機アニオントランスポーター1（OAT1）及び 3（OAT3）は、腎近位尿細管細胞（PTC）の基底外側に選択的に発現し［42］、TFVのPTCへの能動的取込みを仲介する［43］。その結果、腎近位尿細管のTFVへの曝露量が増大し、TDFを投与した患者で腎臓の有害作用が発現する可能性がある。本試験では、OAT1 及びOAT3 を一過性に発現したヒトHEK293T細胞にTAF及びTFVを 4 日間曝露させ、OAT依存的細胞毒性を示す可能性を評価した（試験番号PC-120-2018）［44］。

TFV はトランスポーターのない対照細胞と比較して、OAT1 及び OAT3 発現細胞でより高い細胞毒性を示した（CC_{50} 値の変化がそれぞれ>21 倍及び>3.6 倍）が、TAF の OAT1 及び OAT3 発現細胞に対する細胞毒性は、対照細胞と比較してほとんど変化がなかった（CC_{50} 値の変化がそれぞれ 0.5 倍及び 3.5 倍）（表 2.6.2-16）。対照細胞に対する TAF の細胞毒性は TFV よりも高かったが、これは TAF のより高い受動的細胞透過性に起因すると考えられる。TAF は TFV の負電荷をマスクする親油基を有しているため、細胞透過性がより高い［5］。OAT3 発現細胞で TAF の CC_{50} 値が対照細胞と比較してわずかに上昇したことは、TAF の細胞内濃度増加とは関連がなく、OAT3

による輸送を受けないその他の薬剤（ピューロマイシン及びゲムシタビン）の細胞毒性の変化と類似していた。

このように、TFV とは異なり、TAF は腎トランスポーターOAT1 又は OAT3 と相互作用せず、これらのトランスポーターを一過性に発現したヒト腎上皮細胞で OAT 依存的細胞毒性を示さない。TAF が OAT を介して腎近位尿細管に能動的に蓄積する可能性は低い。TAF を投与した患者では TDF と比較して循環血中 TFV 濃度が低く、TAF の腎臓に対する安全性プロファイルは TDF よりも改善している可能性が示唆される（2.7.4.2.1.5 項）。

表 2.6.2-16　OAT1 及びOAT3 存在／非存在下でのHEK293T細胞に対する TAF及びTFVの*in vitro*細胞毒性

Compound	CC_{50} (µmol/L)[a] (Fold Change)[b]		
	Control Cells	OAT1-Expressing Cells	OAT3-Expressing Cells
TFV	> 2000 (1.0)	94 ± 71 (> 21.3)	553 ± 174 (> 3.6)
TAF	163 ± 42 (1.0)	319 ± 56 (0.5)	47 ± 17 (3.5)

CC_{50} = drug concentration that results in a 50% reduction in cell viability; OAT = organic anion transporter; TAF = tenofovir alafenamide; TFV = tenofovir
a　Data represent mean ± SD from 5 independent experiments performed in triplicate.
b　Control CC_{50}/OAT CC_{50}
Source: Table modified from [44]: Report PC-120-2018

3.2.4.2　TFVの腎近位尿細管毒性

（試験番号 P4331-00037、添付資料番号 4.2.1.2.16、評価資料）

*In vivo*での腎毒性をより詳細に検討するため、ヒト初代RPTECを用いてTFVの細胞毒作用を評価し、ヌクレオチド誘導体（cidofovir及びADV）と比較した（試験番号P4331-00037）［41］。TFV が細胞増殖に及ぼす影響は無視できる程度であり、CC_{50} 値は>2000 µmol/Lであった（表 2.6.2-17）。さらに 25 日後、TFVによる静止期RPTECの長期生存率に対する影響は認められなかった。この結果は、300 µmol/L以下の濃度のTFVに 22 日間曝露してもRPTECの生存率に影響がみられなかった別の報告［45］と一致している。一方、cidofovir及びADVの存在下での静止期RPTECの半減期は、それぞれ約 10 及び 21 日間であった。

近位尿細管上皮は血液と尿の間の選択的バリアを維持するために不可欠である。10 日間インキュベーション後、経上皮抵抗測定により分化した近位尿細管上皮機能への作用を評価した結果、高濃度（3 mmol/L）の TFV でも有意な影響を与えなかった（表 2.6.2-17）［43］。一方、cidofovir 及び ADV は、それぞれ 100～120 µmol/L 及び 1.0～1.2 mmol/L で尿細管上皮細胞の機能を 50%低下させた。

Cidofovir及びADVに関連した腎毒性の原因として、腎近位尿細管上皮の側底膜に局在するタンパク質であるヒト腎OAT1 との関連が指摘されている［46］。また、OAT1 はTFVの腎細胞内蓄積を増加させることにより、TFVの細胞毒性を誘導することが示されている。しかし、TFVと異なりTAFはOAT1 との相互作用はなく、OAT1 の基質ではない（試験番号PC-120-2018）［44］。

輸送試験では、cidofovir、ADV 及び TFV の輸送効率（V_{max}/K_m 比として算出）が同程度であることが明らかになり（表 2.6.2-17）［43］、TFV の腎毒性プロファイルの改善は、腎輸送における相違というよりは、必須の細胞内機能に対する作用の違いによることが示唆された。

表 2.6.2-17　TFV、cidofovir及びADVの*in vitro*腎近位尿細管毒性

In vitro Assay	Tenofovir	Cidofovir	Adefovir
Inhibition of RPTECs growth; CC_{50} [µmol/L][a]	> 2,000	260	495
Viability of RPTECs; $t_{1/2}$ [days][b]	> 25	9.7	21
Integrity of RPTEC epithelium; $CTER_{50}$[c] [µmol/L]	> 3,000	100-120	1,000-1,200
Efficiency of human OAT1-mediated transport [V_{max}/K_m]	3.26	1.77	1.93

CC_{50} = drug concentration that results in a 50% reduction in cell viability; OAT1 = human organic anion transporter 1; RPTEC = renal proximal tubule epithelial cell; TFV = tenofovir; ADV = adefovir
a　CC_{50} was determined after 4 days incubation.
b　In the presence of 500 µmol/L drug.
c　$CTER_{50}$, concentration reducing the transepithelial resistance of RPTEC monolayer cultured on microporous membrane by 50%. Epithelium integrity was evaluated after 10 days incubation.
Source: Report P4331-00037, [43, 41]

3.2.5　ヒト初代骨芽細胞における細胞傷害性

（試験番号 PC-120-2008、添付資料番号 4.2.1.1.3、評価資料）

TDFを含む抗レトロウイルス薬は、臨床試験においてBMDの減少との関連が示唆されている。そこで、TAF及びTFVのヒト初代骨芽細胞に対するCC_{50}値を評価した。細胞毒性及び*In vivo*でのBMD減少との関連性が確認されている 2 種類のPI、ネルフィナビル（NFV）及びLPV［47、48］を対照として用いた（試験番号PC-120-2008）。*In vivo*でのTAFへの曝露条件を再現するため、22 時間ウォッシュアウト付き 1 日 2 時間パルスインキュベーションを 3 日間行った。TFV、NFV及びLPVの曝露条件は、3 日間連続インキュベーションとした。

TAF は、TAF の血漿中 C_{max} の 1033 倍を超える 500 µmol/L 濃度まで、初代骨芽細胞に対する細胞毒性を示さなかった（表 2.6.2-18）。TFV は 1000 µmol/L までの濃度で初代骨芽細胞に対する細胞毒性を示さなかった。この濃度は、TAF 投与時の TFV の血漿中 C_{max} の>20000 倍、TDF 投与時の TFV の血漿中 C_{max} の>1000 倍である。一方、2 種類の PI（NFV 及び LPV）の細胞毒性は、それぞれの C_{max} 値の 3.4 倍及び 1.8 倍であった（タンパク結合率での補正なし）。

TDFがBMDを減少させるメカニズムはほとんど解明されていないが、本試験結果は、E（エルビテグラビル）/C（COBI）/F（FTC）/TAFがE/C/F/TDFと比較して最初の 48 週間投与時に腰椎及び臀部のBMD減少を有意に改善した第 3 相臨床試験結果と一致している［49］。

表 2.6.2-18　ヒト初代骨芽細胞に対するTAFの*in vitro*細胞毒性

Clinical Data		Osteoblast *In Vitro* Assay Data				Ratio
Drug	C_{max} (µmol/L)	Drug	Treatment	N	CC_{50} (µmol/L)[a]	CC_{50}/C_{max}
TAF 25 mg QD	0.484 (TAF)[b]	TAF	2-hour pulse	5	>500	>1033
	0.05 (TFV)[b]	TFV	Continuous	4	>1000	>20000
TDF 300 mg QD	1 (TFV)[c]	TFV	Continuous	4	>1000	>1000
NFV 1250 mg BID	7 (NFV)[d]	NFV	Continuous	4	23.5 ± 4.5	3.4
LPV 800 mg QD[e]	18.7 (LPV)[f]	LPV	Continuous	4	33.5 ± 3.8	1.8

CC_{50} = drug concentration that results in a 50% reduction in cell viability; LPV = lopinavir; NFV = nelfinavir; TAF = tenofovir alafenamide; TDF = tenofovir disoproxil fumarate; TFV = tenofovir; BID = twice daily; QD = once daily
a　Mean ± SD
b　Study GS-US-120-0104, [11]
c　[19]
d　[50]
e　Boosted with RTV 200 mg
f　[51]
Source: Report PC-120-2008

3.2.6　ミトコンドリア毒性

患者で認められるミオパチー、感覚ニューロパチー、乳酸アシドーシス及び脂肪肝などの様々な副作用にN(t)RTI誘発ミトコンドリア毒性が関与している［52、53］。ddC、ddI及びd4Tなど多くのNRTIは、mtDNAポリメラーゼγの阻害のため、細胞におけるmtDNAの減少を引き起こしうる［22、54］。さらに、ZDVなどのNRTIは乳酸の細胞外産生を増加させることがある［54］。現在のところ、B型慢性肝炎治療の既存薬であるNRTIは、HIV-1 治療の既存薬であるNRTIと比較してミトコンドリア毒性を示すエビデンスはほとんどない［22、54、55］。

3.2.6.1　肝細胞株におけるmtDNA量に及ぼすTAF及びTFVの影響

（試験番号 PC-120-2006、添付資料番号 4.2.1.2.6、評価資料）
（試験番号 P1278-00042、添付資料番号 4.2.1.2.17、評価資料）

HepG2 細胞を用いて、TAF が mtDNA 減少を生じる可能性を評価した（試験番号 PC-120-2006）。定量的リアルタイム PCR によって TAF で処理した HepG2 細胞における mtDNA の相対濃度を測定した。本試験では、HepG2 細胞を TAF（0.1、0.3 又は 1.0 µmol/L）で 10 日間処理しても、未処理の細胞と比較して、mtDNA 量の顕著な減少は認められなかった（表 2.6.2-19）。一方、ddC（0.2、2.0 又は 20.0 µmol/L）で処理した細胞は、mtDNA 量の用量依存的な減少を示した。これらのデータは、活性代謝物 TFV-DP が mtDNA ポリメラーゼ γ を阻害しないことが確認されていることと一致しており、TAF が mtDNA 合成を阻害し、NRTI に関連したミトコンドリア毒性を誘発する可能性が低いことを示唆している。

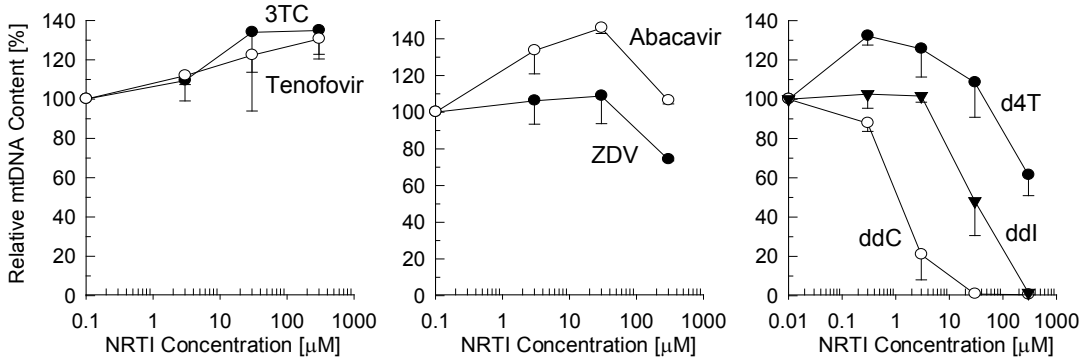
表 2.6.2-19　HepG2 細胞のmtDNA量に対するTAFの作用

Drug	Concentration (µmol/L)	Relative Amount of mtDNA (% mtDNA)[a]	p-value compared with DMSO (Control)[b]
DMSO (control)	-	100.0 ± 15.3	-
TAF	0.1	86.4 ± 30.5	0.190
	0.3	88.1 ± 35.5	0.294
	1.0	94.6 ± 17.3	0.318
ddC	0.2	86.7 ± 24.2	0.127
	2.0	11.5 ± 6.2	< 0.0001
	20.0	6.6 ± 1.5	< 0.0001

ddC = zalcitabine; DMSO = dimethylsulfoxide; mtDNA = mitochondrial DNA; TAF = tenofovir alafenamide
a　Data represent the mean ± SD of 3 independent experiments performed in triplicate.
b　Paired, two-tailed Student's t-test
Source: Report PC-120-2006

TFV 及び NRTI が HepG2 細胞の mtDNA 合成に及ぼす影響を、連続ハイブリダイゼーション解析により算出した mtDNA と染色体 DNA の比に基づいて評価した（試験番号 P1278-00042）[22]。300 µmol/L までの濃度の TFV で 9 日間処理したところ、HepG2 細胞の mtDNA 合成に影響は認められなかった（図 2.6.2- 8）。一方、ddC 及び ddI はそれぞれ 30 及び 300 µmol/L 以下の濃度で mtDNA 量を著明に減少させた。濃度 300 µmol/L の d4T 及び ZDV では影響はさほど顕著ではなく、mtDNA は 30%～40%減少した。TFV と同様に 3TC 及び ABC による mtDNA の相対的レベルの顕著な変化はみられなかった。

図 2.6.2- 8　HepG2 細胞のmtDNA量に対するTFV及びNRTIの作用



3TC = lamivudine; ZDV = zidovudine; ddC = zalcitabine; ddI = didanosine; d4T = stavudine; TFV = tenofovir; mtDNA = mitochondrial DNA; NRTI = nucleoside reverse transcriptase inhibitor
HepG2 human liver cells were incubated with various drug concentrations for 9 days and DNA content was determined by hybridization analysis. Data are the means ± standard deviation from two independent experiments.
Source: Report P1278-00042.

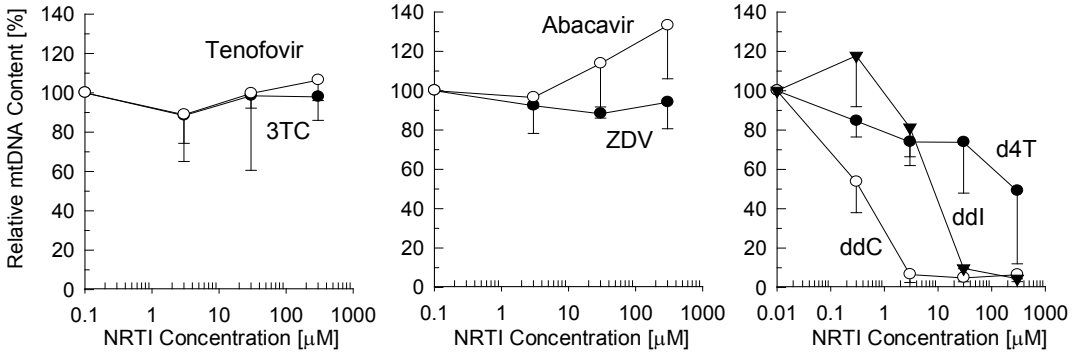
3.2.6.2　　ヒト初代骨格筋細胞のmtDNA量に及ぼすTFVの影響

（試験番号 P1278-00042、添付資料番号 4.2.1.2.17、評価資料）

TFV 及び NRTI の SkMC の mtDNA 合成に及ぼす影響を、連続ハイブリダイゼーション解析により算出した mtDNA と染色体 DNA の比に基づいて評価した（試験番号 P1278-00042）[22]。

300 µmol/L までの濃度の TFV で 9 日間処理したところ、増殖性 SkMC の mtDNA 合成に TFV の影響は認められなかった（図 2.6.2- 9）。同様に、3TC、ABC 及び ZDV も SkMC の mtDNA を減少させなかった。一方、d4T は 300 µmol/L で mtDNA 量を 50%減少させ、ddC 及び ddI はそれぞれ 3 及び 30 µmol/L で mtDNA 量をより顕著に減少させた。静止期の非増殖性 SkMC を 3 週間処理したときも、TFV により mtDNA は減少しなかった結果を含め、検討した薬剤は同様の作用を示した。

図 2.6.2- 9　ヒト骨格筋細胞のmtDNA量に対するTFV及びNRTIの作用



3TC = lamivudine; ddC = zalcitabine; ddI = didanosine; d4T = stavudine; TFV = tenofovir; ZDV = zidovudine; mtDNA = mitochondrial DNA; NRTI = nucleoside reverse transcriptase inhibitor
Primary human skeletal muscle cells were incubated with various drug concentrations for 9 days and DNA content was determined by hybridization analysis. Data are the means ± standard deviation from two independent experiments.
Source: Report P1278-00042.

3.2.6.3　　初代ヒトRPTECのmtDNA量に及ぼすTFVの影響

（試験番号 P1278-00042、添付資料番号 4.2.1.2.17、評価資料）

TFV は腎近位尿細管に発現した OAT1 によって能動輸送されることから、腎臓に蓄積する可能性がある［43］。そこで、TFV 及び既存の NRTI が正常ヒト RPTEC の mtDNA 合成に及ぼす影響を、連続ハイブリダイゼーション解析により算出した mtDNA と染色体 DNA の比に基づいて評価した（試験番号 P1278-00042）［22］。それぞれ 300 µmol/L 及び 200 µmol/L の TFV 及び ZDV で 21 日間処理した後も、分化した RPTEC の mtDNA 量に影響はみられなかった（表 2.6.2-20）。一方、d4T は 200 µmol/L で mtDNA 量をわずかに減少させ、ddC 及び ddI はそれぞれ 2 及び 40 µmol/L で mtDNA 量をより顕著に減少させた。

表 2.6.2-20　ヒト分化RPTECのmtDNA量に対するTFV及びNRTIの作用

Drug	Drug Concentration [μmol/L]	Content of mtDNA [% of control][a]	
		12 days	21 days
TFV	300	118 ± 5.9	109 ± 9.2
ZDV	200	109 ± 3.0	104 ± 14.7
d4T	200	92.3 ± 13.9	77.0 ± 10.9
ddC	2	21.1 ± 1.8	5.1 ± 0.6
ddI	40	47.5 ± 5.3	25.7 ± 0.1

RPTEC = renal proximal tubule epithelial cell; d4T = stavudine; ddC = zalcitabine; ddI = didanosine; mtDNA = mitochondrial DNA; TFV = tenofovir; ZDV = zidovudine; NRTI = nucleoside reverse transcriptase inhibitor
a　Relative content of mtDNA in RPTECs after 12- and 21-day drug treatment given as mean ± standard deviation from a representative experiment performed in duplicates.
Source: Report P1278-00042

3.2.6.4　肝細胞株のミトコンドリアタンパク質量及び細胞内脂質蓄積に及ぼすTFVの影響

（試験番号 TX-104-2001、添付資料番号 4.2.1.2.7、参考資料）

HepG2 細胞のミトコンドリアタンパク質レベルに対する TFV 及び既存の NRTI の影響について免疫ブロット解析により評価した［22］。特に、チトクローム *c* 酸化酵素の COX II 及び COX IV サブユニットは、それぞれ mtDNA 及び核 DNA によってコードされる。300 μmol/L の TFV で 9 日間処理後、COX II 及び COX IV の細胞発現に影響は認められなかった。それとは対照的に、30 μmol/L の ddC 又は 300 μmol/L の ddI で 9 日間処理後、COX II 及び COX IV 発現はそれぞれ >90%及び 40%～50%阻害された。

別の試験で、TFV の HepG2 細胞ミトコンドリア特性に対する影響を評価した（試験番号 TX-104-2001）。1.2 及び 12 μmol/L の TFV で最長 25 日間処理したとき、mtDNA 量、COX II レベル、乳酸産生及び脂質含量に影響はみられなかった。

3.2.6.5　ヒト肝細胞及び骨格筋細胞における乳酸産生に及ぼすTFVの影響

（試験番号 P1278-00042、添付資料番号 4.2.1.2.17、評価資料）

薬物によるミトコンドリアの酸化的リン酸化欠如により、ピルビン酸と乳酸の比がシフトし、乳酸産生が増加する可能性がある［56］。そこで、HepG2 及びSkMCの細胞外乳酸産生に対するTFV及びNRTIの影響を評価した（試験番号P1278-00042）［22］。300 μmol/LまでのTFVでHepG2及びSkMC細胞をそれぞれ 3 及び 6 日間処理後、いずれも未処理の細胞と比較して乳酸産生に影響は認められなかった（表 2.6.2-21）。同様に、3TC処理による乳酸産生への影響もみられなかった。一方、ZDVはHepG2 及びSkMC細胞の両方で乳酸産生を濃度依存的に増加させ、これまでの報告［56］と一致した。

表 2.6.2-21　細胞外乳酸産生に対するTFV及びNRTIの作用

Drug	Concentration (μmol/L)	Lactic Acid Production (mg /10^6 cells)[a]	
		HepG2 cells[b]	SkMCs[b]
None	--	1.61 ± 0.25 (100)	7.53 ± 0.83 (100)
TFV	30	1.34 ± 0.18 (83)	7.23 ± 1.21 (96)
	300	1.62 ± 0.06 (101)	8.79 ± 1.97 (116)
ZDV	30	2.26 ± 0.04 (141)	10.39 ± 0.56 (138)
	300	3.32 ± 0.05 (207)	21.94 ± 4.04 (291)
3TC	30	1.92 ± 0.67 (119)	7.29 ± 1.47 (97)
	300	1.94 ± 0.14 (121)	8.13 ± 0.95 (108)

3TC = lamivudine; SkMC = skeletal muscle cell; TFV = tenofovir; ZDV = zidovudine; NRTI = nucleoside reverse transcriptase inhibitor

a　Extracellular lactate production given as a mean ± standard deviation from a representative experiment performed in duplicate. Data in parentheses represent percentage change from the no drug control.

b　HepG2 cells and SkMCs were incubated with drugs for 3 and 6 days, respectively.

Source: Report P1278-00042, [22]

3.3　ヒト及び動物のウイルス

3.3.1　ヒト及び動物のウイルス分離株に対するTAFの活性

（試験番号 PC-120-2003、添付資料番号 4.2.1.2.8、評価資料）

18 種類のヒト及び動物ウイルスに対するTAF及びTFVの抗ウイルス活性を評価した。これらのウイルスには、アデノウイルス、2 型デング熱ウイルス、インフルエンザA型ウイルス、パラインフルエンザ 3 型ウイルス、RSV、コクサッキーB群ウイルス、ライノウイルス、HSV-1、HSV-2、HCMV、VZV、ワクニシアウイルス、HCV、HIV-1 及びSIVの分離株が含まれる（試験番号 PC-120-2003）［57］）。ウイルス及び細胞を、TAF又はTFV存在下で 2～7 日間インキュベーションし、抗ウイルス活性（EC_{50} 値）及びCC_{50} 値を評価した。

プラークアッセイ法において、TAF は PBMC における HIV-1 及び SIV 分離株の増殖を強力に抑制し、その EC_{50} 値はそれぞれ 2.0～5.9 nmol/L 及び 0.5～1.2 nmol/L であった（表 2.6.2- 22）。評価した残り 14 種類のヒトウイルスのうち 12 種類に対しては、抗ウイルス活性は認められなかった。TAF 及び TFV は、レポーター遺伝子アッセイ法において 2 つの HSV-2 株（KW 及び MS）に対して弱い抑制作用を示し、EC_{50} 値は、それぞれ 424～697 nmol/L 及び 146～278 nmol/L であった。さらに、TAF 単剤ではヒトパラインフルエンザに対する微弱な活性が認められ（EC_{50} 値 843 nmol/L）、これは検討した最高濃度（1000 nmol/L）において認められた細胞増殖抑制作用によるものと考えられた。TAF 及び TFV はいずれも、検討した最高濃度（それぞれ 1000 nmol/L 及び 1000 µmol/L）まで細胞毒性を示さなかった。

以上の結果から、TAF は免疫不全レトロウイルス（すなわち HIV 及び SIV）を強力に抑制する一方、HSV-2 に対しては弱い抑制作用を示し、その他のヒトウイルス病原体に対してはほとんど抑制作用を示さないと考えられる。

表 2.6.2- 22　各種ヒトウイルス及びサル免疫不全ウイルス（SIV）に対する TAF及びTFVの抗ウイルス活性

Viruses	Cell Line	TAF (nmol/L)		TFV (µmol/L)		Positive Control
		EC_{50} [a]	CC_{50} [b]	EC_{50} [a]	CC_{50} [b]	
$HIV\text{-}1_{NL4\text{-}3}$	PBMC	5.9	> 1000	2.3	> 100	ZDV
$HIV\text{-}1_{BaL}$	PBMC	2.0	> 1000	1.1	> 100	ZDV
$HIV\text{-}1_{BaL}$	MAGI R5	8.7	> 1000	3.6	> 100	TAK 779, AMD 3100
SIV_{mac239}	PBMC	1.2	> 1000	0.7	> 1000	ZDV
SIV_{mac251}	PBMC	0.5	> 1000	0.4	> 1000	ZDV
Adenovirus	HeLa	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	RBV
Dengue Virus	Huh7	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	RBV
HCV	Huh-Luc/Neo ET	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	rIFN-α
Coxsackie B Virus	Vero	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	enviroxime
Rhinovirus	MRC-5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	enviroxime
Vaccinia	Vero E6	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	cidofovir
Influenza A	MDCK	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	zanamivir, RBV
Human parainfluenza	Vero	843	> 1000[c]	> 1000[d]	> 1000[c]	enviroxime
RSV	Vero	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	RBV
VZV	MRC-5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	acyclovir
HCMV	MRC-5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	ganciclovir
HSV-1	MRC-5	> 1000	> 1000	> 1000[d]	> 1000	acyclovir
$HSV\text{-}2_{KW}$	MRC-5	> 1000	> 1000	29.0	> 1000	acyclovir
$HSV\text{-}2_{KW}$	MAGI R5	424	> 1000	146	> 1000	acyclovir
$HSV\text{-}2_{MS}$	MAGI R5	697	> 1000	278	> 1000	acyclovir

CC_{50} = concentration inhibiting cell growth by 50%; EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; HCV = hepatitis C virus; HCMV = human cytomegalovirus; HIV = human immunodeficiency virus; HSV = herpes simplex virus; IFN = interferon; RBV = ribavirin; RSV = respiratory syncytial virus; SIV = simian immunodeficiency virus; TAF = tenofovir alafenamide; TFV = tenofovir; VZV = varicella zoster virus; ZDV = zidovudine

a　EC_{50} values determined by plaque reduction or reporter gene assay

b　CC_{50} values determined by reduction of cytopathic effect or reporter gene assay

c　Cell growth inhibition observed at the highest tested drug concentration.

d　Viral inhibition observed at the highest tested drug concentration.

Source: Report PC-120-2003

3.4　ヒト免疫不全ウイルス（HIV）

3.4.1　*In vitro*抗HIV活性

3.4.1.1　臨床及び組換え型HIV-1 分離株に対するTAFの活性

（試験番号 PC-120-2004、添付資料番号 4.2.1.2.9、評価資料）
（試験番号 PC-120-2017、添付資料番号 4.2.1.2.10、評価資料）
（試験番号 PC-120-2021、添付資料番号 4.2.1.2.3、評価資料）

ヒト初代 PBMC において、HIV-1 の M 群サブタイプ A～G を含む全ての HIV-1 群（M、N、O）を代表する 26 株の野生型 HIV-1 臨床分離株に対する TAF の抗 HIV 活性を評価した（試験番号 PC-120-2004）。ウイルスと活性化 PBMC を TAF 又はジドブジン（ZDV）存在下で 7 日間インキュベーションし、抗ウイルス活性（RT 活性阻害作用、EC_{50}）及び CC_{50} 値を評価した。

TAF は評価した全ての HIV-1 群／サブタイプに対して概して強力な抗ウイルス活性を示した（表 2.6.2- 23）。26 株の分離株に対する EC_{50} 値は 0.10～12.0 nmol/L の範囲であり、全株の平均 EC_{50} は 3.5 nmol/L であった。評価したいずれの HIV-1 群／サブタイプでも、TAF の平均 EC_{50} 値に明らかな違いは認められなかった。TAF 又は ZDV はいずれも、検討した最高濃度（それぞれ 500 nmol/L 及び 1000 nmol/L）まで、細胞毒性を示さなかった。

表 2.6.2- 23　HIV-1 臨床分離株に対するTAFの抗ウイルス活性

Primary HIV-1 Isolates				EC_{50} (nmol/L)	
Type	**Group**	**Subtype**	**Isolate ID**	**TAF**	**ZDV**
HIV-1	M	A	92UG029	8.8	26.4
			92UG037	0.7	2.1
			92RW016	0.7	1.5
		B	93BR021	9.7	48.0
			JR-CSF	1.1	2.0
			90US873	3.9	6.0
		C	92BR025	4.2	9.0
			98BR004	1.8	7.6
			93IN101	1.5	5.5
		D	92UG001	3.8	11.3
			92UG046	1.0	3.3
			92UG024	6.3	7.2
		E	93TH073	1.2	3.5
			CMU06	1.4	4.1
			CMU08	5.9	13.1
		F	93BR019	0.7	4.9
			92BR024	6.0	17.1
			93BR029	0.1	1.3
			93BR020	2.2	7.4
		G	G3	5.3	14.0
			RU570	12.0	66.4
			JV1083	9.9	27.4
	N	NA	YBF30	2.0	5.2
	O	NA	BCF02	1.3	1.2
			BCF03	3.0	7.2
			BCF07	0.1	3.8

EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; TAF = tenofovir alafenamide; ZDV = zidovudine; NA = notapplicable; HIV = human immunodeficiency virus
Source: Report PC-120-2004

別の試験では、多様な背景を有する 13 例のドナーに由来する活性化ヒト初代 $CD4^+$ T リンパ球（CD4）及び単球由来マクロファージ（MDM）において、TAF の抗 HIV 活性を評価した（試験番号 PC-120-2017）。CD4 は、VSV-G 偽型 $HIV\text{-}1_{NL4\text{-}3}$ を感染させ、薬物存在下で 3 日間インキュベートした。一方、MDM は $HIV\text{-}1_{BaL}$ を感染させ、薬物存在下で 14 日間インキュベートした。TAF は TFV よりも CD4 と MDM において、それぞれ 600 倍及び 80 倍以上効力が高かった。全て

のドナーを通じて、TAF の抗ウイルス活性の相対範囲は、検討した既存の HIV-1 RT 阻害剤（ZDV 及びエファビレンツ：EFV）と同程度であり、CD4 及び MDM における TAF EC_{50} 値の平均値±SD（範囲）は、それぞれ 11.0±3.4（6.6～19.9）nmol/L 及び 9.7±4.6（2.5～15.7）nmol/L であった。

最後に、TAF の 2 つの代謝物 M18（GS-645552）及び M28（GS-652829）について、MT-2 及び MT-4 細胞を用いて、HIV-1_{IIIB} に対する抗 HIV 活性を 5 日間のインキュベーション後に評価した（試験番号 PC-120-2021）。両 TAF 代謝物は、弱い HIV-1 複製阻害作用を示した。TAF と比較して、M18 の阻害作用は 1/121～1/130（EC_{50} 値：0.56～0.97 µmol/L）、M28 の阻害作用は 1/1723～1/2630 であった（EC_{50} 値：7.41～21.04 µmol/L）。

3.4.1.2　　HIV-2 臨床分離株に対するTAFの活性

（試験番号 PC-120-2004、添付資料番号 4.2.1.2.9、評価資料）

ヒト初代 PBMC において、3 株の野生型 HIV-2 臨床分離株に対する TAF の抗ウイルス活性を評価した（試験番号 PC-120-2004）。ウイルスと活性化 PBMC を TAF 又は ZDV 存在下で 7 日間インキュベートし、抗ウイルス活性（RT 活性阻害、EC_{50}）及び CC_{50} 値を評価した。

表 2.6.2- 24 に示すように、TAF は 3 株全ての HIV-2 分離株を強力に抑制し、その EC_{50} 値は 0.91～2.63 nmol/L であった。TAF 又は ZDV はいずれも、検討した最高濃度（それぞれ 500 及び 1000 nmol/L）まで、細胞毒性を示さなかった。

表 2.6.2- 24　HIV-2 臨床分離株に対するTAFの抗ウイルス活性

Primary HIV-2 Isolates				EC_{50} (nmol/L)	
Type	**Group**	**Subtype**	**Isolate ID**	**TAF**	**ZDV**
HIV-2	NA	NA	CDC310319	2.63	15.6
			CDC310342	1.96	1.39
			CBL-20	0.91	2.18

EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; TAF = tenofovir alafenamide; ZDV = zidovudine; NA = notapplicable; HIV = human immunodeficiency virus
Source: Report PC-120-2004

3.4.2　*In vitro*選択性指数

3.4.2.1　　TAF、TDF及びTFVの抗HIV活性及び細胞毒性

（試験番号 PC-120-2004、添付資料番号 4.2.1.2.9、評価資料）
（試験番号 PC-120-2007、添付資料番号 4.2.1.2.2、評価資料）
（試験番号 PC-120-2009、添付資料番号 4.2.1.2.1、評価資料）

MT-2 細胞、MT-4 細胞及び PBMC において、TAF、TFV 及び TDF の HIV-1 に対する抗ウイルス活性（EC_{50} 値）及び CC_{50} 値を *in vitro* で評価した（試験番号 PC-120-2004、PC-120-2007 及び

PC-120-2009）。TAF は、HIV-1_{IIIB} 及び全ての HIV-1 群（M、N、O）を代表する一連の野生型 HIV-1 臨床分離株に対して、強力な抗ウイルス活性を示した（表 2.6.2- 25）。TAF は透過性が高いため、MT-2 細胞及び MT-4 細胞における TAF の抗 HIV 活性は、それぞれ TFV の 228 倍及び 1232 倍であった。これに対して、同じ細胞種における TDF の抗 HIV 活性は、TFV の 55 倍及び 729 倍であった。TAF、TDF 及び TFV の細胞毒性は、検討した最高濃度においても弱いものであった。以上の結果に基づき、MT-2 細胞及び MT-4 細胞における TAF の SI 値は、それぞれ>3607 及び 1997 であった。これに対して、TDF の SI 値は 604 及び 1167 であり、TFV の SI 値は 2265 及び 438 であった。MT-2 細胞におけるこれらの SI 値はこれまでに MT-2 細胞で報告されている TAF（8000）、TFV（1250）及び TDF（1000）の値［18］の 0.45～1.8 倍の範囲内であり、これらは細胞ローディングの軽微な差を反映していると考えられる。

表 2.6.2- 25　TAF、TFV及びTDFの抗HIV活性及び細胞毒性

	Cells/Virus								
	MT-2/HIV-1_{IIIB}			MT-4/HIV-1_{IIIB}			PBMC[b]/HIV-1_{IIIB}		
Drug	EC_{50} (μmol/L)	CC_{50} (μmol/L)	SI[a]	EC_{50} (μmol/L)	CC_{50} (μmol/L)	SI[a]	EC_{50} (μmol/L)	CC_{50} (μmol/L)	SI[a]
TAF	0.0147	> 53.0	>3607	0.0116	23.2	1997	0.0035[c]	6.8	1943
TDF	0.0614	37.1	604	0.0196	22.9	1167	NA	NA	NA
TFV	3.3565	7605	2265	14.292	6264	438	NA	NA	NA

CC_{50} = concentration that resulted in 50% cytotoxicity; EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; NA = not available; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; SI = selectivity index; TAF = tenofovir alafenamide; TDF = tenofovir disoproxil fumarate; TFV = tenofovir; HIV = human immunodeficiency virus
a　Ratio of CC_{50} to EC_{50}.
b　Data is shown for activated PBMCs.
c　Data represents the mean EC_{50} value from 26 primary HIV-1 isolates.
Source: Reports PC-120-2004, PC-120-2007, and PC-120-2009

3.4.3　*In vitro*におけるHIV-1 耐性の評価

3.4.3.1　　野生型組換えHIV-1 を用いた*in vitro*耐性発現試験

（試験番号 PC-120-2011、添付資料番号 4.2.1.2.11、評価資料）

In vivo 及び *in vitro* での TDF 及び TFV に対する HIV-1 の耐性は、主に K65R 変異に関連しており［6、7］、少なからず K70E も関連している［7］。

HIV-1_{IIIB} 感染 MT-2 細胞を用いた 2 回の独立した用量漸増耐性発現実験において、TFV と TAF の耐性プロファイルを検討した（試験番号 PC-120-2011）。HIV-1 の遺伝子型及び表現型の変化をそれぞれポピュレーションシークエンシング及び *in vitro* 感受性分析によって経時的にモニタリングした。

TAF及びTFVどちらもHIV-1_{IIIB}連続継代中に開始時EC_{50}値の 4～15 倍の濃度でK65R変異が出現した。ほとんどのTAF（2 試験中 1 試験）及びTFV（2 試験中 2 試験）の耐性発現試験において、K65R変異に伴いS68N変異又はS68S/N変異が認められ、これまでのTDF及びTFVを用いた試験［58、7］及びK65Rによる複製能の部分的回復［59］を示した試験結果と一致する。その他の

TAF耐性発現試験（2 試験中 1 試験）では、K65R変異に伴い一過性のK70K/E変異が認められ、これもTDFを用いた試験結果と一致した［7］。K70E変異は、K65R変異によるTFVの感受性［60］及び複製能力低下［61］に関連している。開始時EC_{50}値の 16 倍を超える濃度のTAF及びTFVでは、更なる耐性変異又はウイルス複製は認められなかった。

処理 148 日目以降、TAF 及び TFV 耐性ウイルスに対する TAF の抗ウイルス活性は、いずれも野生型ウイルスの 1/6.5 に有意に低下した。これに対し、TAF 及び TFV 耐性ウイルスに対する TFV の抗ウイルス活性は、それぞれ野生型ウイルスの 1/5.5 及び 1/5.1 に有意に低下した（表 2.6.2- 26）。しかし、上記耐性ウイルスに対する TAF 及び TFV 抗ウイルス活性の差は有意なものではなかった。最後に、TAF 及び TFV 耐性ウイルスに対する FTC の抗ウイルス活性は同程度に低下したが（野生型ウイルスの 1/8.5 及び 1/6.7）、対照薬 EFV 及びエルビテグラビル（EVG）の抗ウイルス活性は変化しなかった。

概して TAF 及び TFV の耐性発現試験において K65R 変異又は K65R+S68N 変異が発現し、薬物感受性が中程度に低下したが、培養期間を延長しても高レベルの耐性は発現せず、ほぼ同一の耐性プロファイルを示した。

表 2.6.2- 26　TAF及びTFV耐性発現試験におけるHIV-1 遺伝子型及び表現型解析

Drug	Final Concentration (FC over EC_{50})	Final Time Point	RT Mutation(s)	EC_{50} FC from WT Control ($HIV\text{-}1_{IIIB}$)[a, b]				
				NRTI			NNRTI	INSTI
				TAF	TFV	FTC	EFV	EVG
TAF	224 nmol/L (16×)	Day 148	K65R	6.5[b]	5.5[b]	8.5[b]	1.4	1.7
TFV	56 µmol/L (16×)	Day 154	K65R, S68S/N/R/K	6.5[b]	5.1[b]	6.7[b]	1.5	1.4

EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; EFV = efavirenz; EVG = elvitegravir; FC = fold-change; FTC = emtricitabine; INSTI = integrase strand transfer inhibitor; NNRTI = nonnucleoside RT inhibitor; NRTI = nucleos(t)ide RT inhibitor; TAF = tenofovir alafenamide; TFV = tenofovir; WT = wild-type; HIV = human immunodeficiency virus

a　Fold changes (FC) of mean EC_{50} values against different classes of drugs obtained from 5 independent experiments. EC_{50} values against $HIV\text{-}1_{IIIB}$ in multiple-round replication assay for TAF, TFV, EVG, FTC, and EFV were 10 nmol/L, 2.9 µmol/L, 1.2 nmol/L, 0.77 µmol/L, and 1.5 nmol/L, respectively.

b　P-value < 0.05 comparing mean EC_{50} with wild-type (WT) control using two-tailed Student's t-test.

Source: Report PC-120-2011

3.4.3.2　ヌクレオシ（チ）ド耐性HIV分離株を用いた*in vitro*耐性発現試験

（試験番号 PC-120-2012、添付資料番号 4.2.1.2.12、評価資料）
（試験番号 PC-120-2013、添付資料番号 4.2.1.2.13、評価資料）

既存の TDF 耐性変異を有する HIV-1 臨床分離株を用いた用量漸増耐性発現試験において、TFV 及び TAF の耐性プロファイルを検討した（試験番号 PC-120-2012）。K65R 変異、チミジンアナログ 3 変異（3TAMs：M41L、L210W 及び T215Y）、又は K65R + Q151M 複合（cpx）多剤耐性（MDR）変異（A62V、S68G、V75I、F77L、F116Y 及び Q151M）を有するウイルスを MT-2 細胞に感染させた。開始時 EC_{50} 値の 2.5 倍までの濃度の TAF 又は TFV と 6 ヵ月間培養後、検討したいずれのウイルスにおいても更なる耐性変異は認められなかった。

次に既存の TDF 耐性変異を有する HIV-1 臨床分離株を用いて、TAF 又は TDF *in vivo* 投与時の TFV-DP 濃度を再現した TAF 又は TFV 濃度でウイルスブレイクスルー試験を実施した（試験番号 PC-120-2013）。3TAMs、K65R、Q151Mcpx、4TAMs 又は T69S-SG 変異を二重導入（ins）したウイルスは、生理的濃度の TAF によって完全に抑制されたが、TFV では抑制されなかった。TAF 及び TFV に対して最も高い耐性を示す 5TAMs ウイルスに対しては、いずれの薬剤もウイルスブレイクスルーを抑制することができなかった。*In vivo* で TAF 25 mg を 1 日 1 回投与したときに得られる細胞内 TFV-DP 濃度は、TDF 300 mg の 1 日 1 回投与と比較して約 5 倍高いため（本項 2.1.3.2 章）、TAF は既存の TDF 耐性分離株に対する抗ウイルス活性を維持できる可能性があり、TDF 耐性ウイルスに感染した患者に対して TAF が有効である可能性が示唆される。

3.4.4　*In vitro*における薬剤耐性変異株に対する抗HIV活性の評価

3.4.4.1　　ヌクレオシ（チ）ド耐性HIV-1 臨床分離株に対するTAF（及びTFV）の活性

（試験番号 PC-120-2014、添付資料番号 4.2.1.2.14、評価資料）

ABC、ddI、FTC、3TC、d4T、ZDV及びTFVについて、HIV-1 におけるNRTI-R変異が同定されている［62］。TFVは、ddI-R（L74V）、ddC-R（T69D）、ZDV-R（D67N＋K70R、T215Y又はD67N＋K70R＋K219Q）又は多剤ヌクレオシド（ヌクレオチド）-R（Q151Mcpx）変異株に対して、強力な抑制作用（野生型の 2 倍以内）を示すことが明らかになっている［63、64、65］。1TAM変異有り又は無しのFTC/LAM/ABC-R変異M184V/Iに対して、TFVは感受性を示し、その活性は若干強くなったが［66、67、68］、ウイルス適応性は低下した［69、70］。T69Sins有り又は無しの 3TAMs（M41L＋L210W＋T215Y）に対してTFVは耐性を示し、TDF処置に対する反応が低下した［71］。

様々なNRTI-R変異を含む 24 種のHIV-1 臨床分離株に対するTAF及びTFVの抗ウイルス活性を評価した（試験番号PC-120-2014）。各ウイルスに対する抗ウイルス薬の感受性は、[redacted]社（South San Francisco, CA, USA）が、シングルサイクル感染性アッセイ（PhenoSense® GT）［72］を用いて検討した。このアッセイにおいて、TFVについては感受性カットオフが確立されたが（TFV EC_{50} FC 1.4 未満は感受性、4 以上は耐性、1.4 以上 4 未満は感受性低下）、TAFについては、カットオフは確立されなかった。

TFV に対して、24 分離株のうち 11 株は完全な感受性を示し、7 株では感受性が低下し、6 株は耐性を示した（表 2.6.2- 27）。TFV に感受性を示した分離株の大多数は、M184V 変異（11 株中 8 株）に加えて、さらにいくつかの NRTI-R 変異（K65R、no TAMs）を保有していた。TFV に対する感受性が低下した分離株では、M184V 変異は稀であり（7 株中 1 株）、さらに複合的な耐性変異パターン（すなわち、≥3TAMs、K65R 単独、又は Q151Mcpx）が認められた。TFV 耐性を示した分離株では、6TAMs、Q151Mcpx＋K65R、若しくは T69ins＋NRTI-R 及び／又は TAM が認められた。

表 2.6.2- 27　ヌクレオシ（チ）ド耐性変異HIV-1 臨床分離株に対する TAF及びTFVの抗ウイルス活性

Isolate ID	Type	RT Mutation(s)	EC_{50} FC from WT[a, b]	
			TAF	TFV
13	NRTI	L74V	0.3	0.4
16	NRTI + M184V	L74V Y115F M184V[c]	0.4	0.5
05	M184V	M184V	0.5	0.5
14	NRTI	L74V	0.4	0.5
22	Q151M + M184V	Q151M M184V[c]	0.6	0.5
15	NRTI + M184V	L74V Y115F M184V[c]	0.5	0.6
06	M184V	M184V[c]	0.7	0.7
21	Q151M + M184V	A62V V75V/I F116Y Q151M M184V[c]	0.8	0.8
20	Q151M	F116Y Q151M[c]	0.9	0.9
11	K65R + M184V	A62A/V K65R M184V[c]	0.8	1.0
12	K65R + M184V	K65R M184V[c]	1.1	1.2
09	K65R	K65R[c]	1.7	1.5
10	K65R	K65R[c]	1.9	1.7
17	3TAMs	M41L L74V L210W T215Y	1.6	1.8
03	6TAMs + M184V	M41L D67N K70R M184V L210W T215Y K219E	2.1	2.3
19	Q151Mcpx	A62V V75I F77L Y115F F116Y Q151M[c]	3.4	2.8
01	6TAMs	M41L D67N K70R L210W T215F K219Q[c]	3.6	3.5
18	5TAMs	M41L D67N T69D L74V L210W T215Y K219R[c]	8.8	3.8
02	6TAMs	M41L D67N K70R L210W T215Y K219E[c]	4.8	4.0
04	6TAMs + M184V	M41L D67N K70R M184V L210W T215Y K219E[c]	9.2	6.1
24	Q151Mcpx + K65R	A62V K65R K70K/R V75I F77L F116Y Q151M[c]	9.1	9.6
08	T69Sins	M41L T69Sins L74V L210W T215Y[c]	20.0	18.0
23	T69Sins	M41L A62V T69Sins L210W T215Y[c]	22.0	19.0
07	T69Sins	A62V T69Sins V75I[c]	23.0	20.0

EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; Q151Mcpx = Q151M multidrug resistance complex (A62V, V75I, F77L, F116Y, and Q151M); RT = reverse transcriptase; TAMs = thymidine-analog resistance mutations (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, and K219Q/E/N/R); T69Sins = T69S double insertion (T69S-SS, -SA, or -SG); TAF = tenofovir alafenamide; TFV = tenofovir; WT = wild-type; HIV = human immunodeficiency virus

a　Fold change (FC) in EC_{50} value relative to WT HIV-1_{NL4-3} control obtained in single-cycle infection assay, PhenoSense® GT ([redacted], South San Francisco, CA, USA) [72]

b　EC_{50} values against WT HIV-1_{NL4-3} control for TAF and TFV were 10 nmol/L and 0.6 µmol/L, respectively

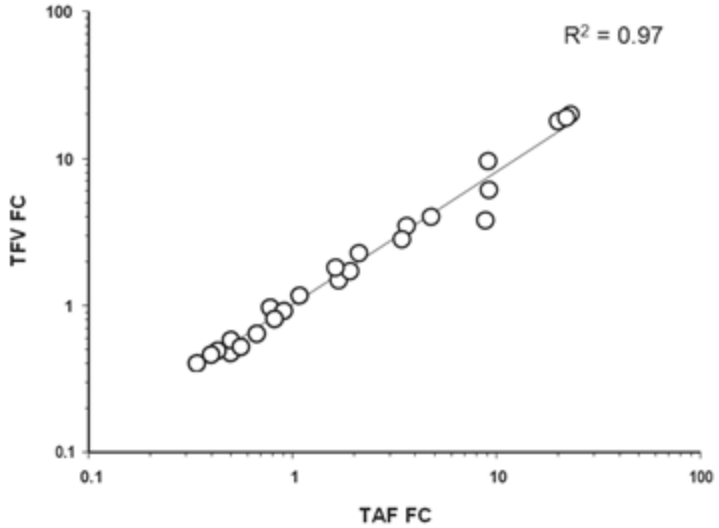
c　Indicates the presence of NNRTI RAMs (not shown).

Source: Report PC-120-2014

野生型対照と比較したときの EC_{50} FC については、この NRTI-R 変異を保有する 24 株の HIV-1 臨床分離株の TFV への感受性は、TAF とほぼ同一であり、若干のばらつきは確率論的なものである可能性が高い。結果として、TFV と TAF の EC_{50} FC には強い相関が認められ、決定係数（R^2）値は 0.97 であった（図 2.6.2- 10）。

以上の結果を総合すると、TAF と TFV は、HIV-1 における NRTI-R 変異に対して、同様の耐性プロファイルを示すと考えられる。

図 2.6.2- 10　耐性変異HIV-1 臨床分離株に対するTAF及びTFVの耐性プロファイル



TAF = tenofovir alafenamide; TFV = tenofovir; HIV = human immunodeficiency virus
Fold-change (FC) of TAF and TFV EC_{50} values for the panel of 24 clinical HIV-1 isolates with NRTI-R mutations (表 2.6.2-27) as plotted, followed by linear regression analysis using SigmaPlot software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).
Source: Report PC-120-2014

4　安全性薬理試験

全ての安全性薬理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、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A（安全性薬理試験ガイドライン）に従って実施された。*In vivo* 安全性薬理試験は、50 mmol/L クエン酸に溶解した TAF（モノフマル酸塩）を使用して実施した。*In vitro* hERG 試験では、TAF（ヘミフマル酸塩）をジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid（HEPES）緩衝生理食塩水で希釈し、最終濃度を 0.3% DMSO とした。

4.1　中枢神経系

（試験番号 R990188、添付資料番号 4.2.1.3.1、評価資料）

Sprague Dawley ラットに TAF（モノフマル酸塩）0、100 又は 1000 mg/kg（0、80 又は 800 mg f.b.e./kg）で単回経口投与したときの中枢神経系に及ぼす影響を評価した（試験番号 R990188）。TAF の中枢神経系に対する無作用量は 1000 mg/kg であった。

4.2　心血管系

4.2.1　*In vitro*

（試験番号 PC-120-2005、添付資料番号 4.2.1.3.2、評価資料）

hERG カリウム電流に対する TAF（1 及び 10 µmol/L）の影響を評価した。溶媒対照の値と比較して、1 及び 10 µmol/L の TAF（ヘミフマル酸塩）による有意な hERG 阻害作用は認められなかった（$p < 0.05$；Dunnett's multiple comparison test）。TAF の hERG カリウム電流に対する阻害作用の IC_{50} 値は 10 µmol/L を超えると推定された（試験番号 PC-120-2005）。

4.2.2　*In vivo*

（試験番号 D2000006、添付資料番号 4.2.1.3.3、評価資料）

テレメトリー装着の覚醒ビーグル犬に 30 又は 100 mg/kg（24 及び 80 mg f.b.e./kg）の TAF（モノフマル酸塩）を経口投与しても、心拍数、体血圧及び心電図（ECG）に薬理学的な影響は認められなかった（試験番号 D2000006）。また、thorough QT 試験（2.7.2.2.2.1.1 項）でも脈拍数の低下及び ECG パラメーターの変化は認められなかった。

イヌ 39 週間経口投与毒性試験において、TAF（モノフマル酸塩）最高用量（18/12 mg/kg/日；試験途中で 18 mg/kg/日から 12 mg/kg/日に減量）でPR間隔の延長傾向が認められた（2.6.6.3.6 項）。この微小な変化は、体重増加抑制、骨及び腎毒性並びに血清T3［73、74］の低値を伴っていた。

4.3　消化器系

（試験番号 R990187、添付資料番号 4.2.1.3.4、評価資料）

TAF（モノフマル酸塩）を雄 Sprague Dawley ラットに経口投与したとき、1000 mg/kg（800 mg f.b.e/kg）でコントロールに比べ胃排出速度が約 3 倍低くかった（試験番号 R990187）。100 mg/kg（80 mg f.b.e./kg）では、胃排出に対する明確な影響はみられなかった。1000 mg/kg 投与 2 時間後、チャコールの腸通過の低下が認められたが、これは胃排出の低下に起因していた可能性がある。TAF 100 mg/kg は、胃排出又は腸運動に影響を及ぼさないと考えられた。

4.4　腎臓系

（試験番号 R990186、添付資料番号 4.2.1.3.5、評価資料）

雄 Sprague Dawley ラットに TAF（モノフマル酸塩）0、100 又は 1000 mg/kg（80 又は 800 mg f.b.e./kg）を単回経口投与したときの腎臓系に及ぼす影響を評価した（試験番号 R990186）。1000 mg/kg ではカルシウムの尿中排泄量が増加したが、これは血清中カルシウム濃度の上昇と相関しており、腎臓が血清中のカルシウム負荷を低減するために機能していることを示している。雄ラットの腎臓系に対する薬理作用の無作用量は 1000 mg/kg であった。

5　薬力学的薬物相互作用

5.1　既存のN(t)RTIとの併用下におけるTFVの代謝活性化

B型慢性肝炎及びHIV-1 の治療に同じ細胞内活性化経路を持つNRTI及びNtRTIを併用する場合、併用により単剤の抗ウイルス活性や毒性に影響を与える可能性があるため、細胞内リン酸化に及ぼす併用の影響を知ることは重要である。一般的に、同じ活性化経路を持つNRTI及びNtRTIは相互作用する可能性があるが、必ずしも全ての相互作用が抗ウイルス活性を低下させるとは限らない［75］。

TFV及びABCからそれぞれの活性代謝物TFV-DP及びカルボビル三リン酸（CBV-TP）への細胞内リン酸化に対する拮抗作用を、Tリンパ芽球様CEM細胞を用いて検討した［76］。細胞をTFV 10 µmol/L又はABC 10 µmol/Lそれぞれ単剤及び併用で 24 時間インキュベートした後、リン酸化代謝生成物並びに内在dATP及びdGTP濃度をLC/MS/MSにより測定した。

表 2.6.2- 28 に示すように、CEM 細胞とインキュベートした後に TFV 及び ABC から生成した活性代謝物の濃度は、両薬剤を併用しても有意な変化を示さなかった。さらに、TFV 及び ABC とそれぞれ競合する内在基質、dATP 及び dGTP 濃度は変化しなかった。ヒト初代 PBMC においても同様の結果が得られた。以上の結果から、TFV と ABC の代謝経路は一致せず、薬物相互作用を生じる可能性は低いことが示される。これらの結果は、PBMC に TFV 及び ABC を併用すると相加的な抗 HIV 活性が認められたという結果と一致する［76］。

表 2.6.2- 28　TFV（10 mol/L）及びABC（10 µmol/L）単独又は併用による各代謝物濃度並びにdATP及びdGTP濃度に対する作用

Cell Type	Metabolite	Intracellular Concentration (pmol/10^6 cells)		
		TFV Alone	ABC Alone	TFV + ABC
CEM	TFV	1.42	n/a	1.59
	TFV-MP	0.53	n/a	0.47
	TFV-DP	1.49	n/a	1.44
	CBV-TP	n/a	0.12	0.18
	dATP[a]	40.3	40.3	41.7
	dGTP[a]	20.5	22.8	23.8

ABC = abacavir; CBV-TP = carbovir triphosphate; dATP = 2'-deoxyadenosine triphosphate; dGTP = 2'-deoxyguanosine triphosphate; n/a = not applicable; TFV = tenofovir; TFV-MP = tenofovir monophosphate; TFV-DP = tenofovir diphosphate; Following a 24-hour incubation with 10 µmol/L TFV and/or 10 µmol/L ABC, formation of phosphorylated anabolites and natural dATP and dGTP pools in CEM cells were determined by LC/MS/MS. Data are mean values from 4 independent experiments performed in cells from two separate donors .
a　Intracellular concentrations of dATP and dGTP in untreated CEM cells were 42.7 and 23.7 pmol/10^6 cells, respectively
Source: [76]

TFVとddIの併用は、*in vitro*における両薬剤のリン酸化代謝物濃度［2］及び内在性細胞内dNTP濃度に対して影響しない［77］。別の*in vitro*試験によって、TFV-MP及びTFV-DPが、ddIの代謝分

解に関与するプリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）の加リン酸分解活性を阻害する可能性があることが示された［78］。したがって、TDFを含む療法において血漿中ddI濃度が上昇したという臨床所見［79］は、TFVのPNP阻害作用によるddI分解阻害が原因であると考えられる。

5.2　併用による*in vitro*抗HBV活性

5.2.1　TFV及び既存のN(t)RTIとの併用による抗HBV活性

（試験番号 PC-174-2006、添付資料番号 4.2.1.4.4、評価資料）

テトラサイクリン誘導プロモーターの制御下でHBVを発現するHepAD38 細胞において、TFV及び既存のN(t)RTIを併用したときの抗HBV活性を評価した（試験番号PC-174-2006）。4 日間の薬物処理後、リアルタイムPCRによって細胞内HBV DNAを定量した。Bliss Independenceモデル（MacSynergy IIソフトウェア）［80、81］及びLoewe Additivityモデル（アイソボログラム分析）［82］に基づきデータ解析を行った。

TFVをLAM、TBV、ETV又はアデホビル（AFV）と併用した結果、MacSynergy分析及びアイソボログラム分析によって、相加的抗ウイルス効果が認められた（表 2.6.2- 29）。TFVとFTCの併用を評価した結果、MacSynergy分析では相加効果が認められ、アイソボログラム分析では相加効果～軽微な相乗効果が認められた。検討したいずれの薬物の併用においても、細胞毒性又は拮抗作用は認められなかった。以上の結果は、異なるHBV発現細胞株においてTFVとAFVの併用が相加効果を示したというこれまでの結果と一致する［83］。

表 2.6.2- 29　TFVと既存のN(t)RTIとの併用による抗HBV活性

Drug Combination	Class	MacSynergy Analysis[a]			Isobologram Analysis[b]	
		Volume [(μmol/L)^2%]				
		Synergy[a]	Antagonism[a]	Net Effect	D Value Range[c]	Net Effect
TFV + FTC	NRTI	6	-2	Additive	-0.25 to -0.12	Additive/Synergy
TFV + LAM	NRTI	7	-11	Additive	-0.17 to 0.12	Additive
TFV + ETV	NRTI	0	-10	Additive	0.036 to 0.24	Additive
TFV + TBV	NRTI	4	-9	Additive	0.066 to 0.047	Additive
TFV + AFV	NtRTI	2	-14	Additive	-0.12	Additive

AFV = adefovir; ETV = entecavir; FTC = emtricitabine; LAM = lamivudine, 3TC; TBV = telbivudine; TFV = tenofovir; HBV = hepatitis B virus; N(t)RTI = nucleos(t)ide RT inhibitor

a　Mean synergy and antagonism volumes at 95% confidence interval [(μmol/L)^2%] from at least 3 independent experiments performed in five replicate. Net effect as defined by Prichard et al. [80, 81]. Synergy volumes of ≥ -25 to < 25 (μmol/L)^2% indicate an additive effect; ≥ 25 to < 50 (μmol/L)^2% indicate minor synergy; ≥ 50 to < 100 (μmol/L)^2% indicate moderate synergy; ≥ 100 (μmol/L)^2% indicates strong synergy. Antagonism volumes of ≥ −50 to < −25 indicate minor antagonism, ≥ −100 to < −50 indicate moderate antagonism, and < −100 indicates strong antagonism.

b　D = deviation from additivity and is a result of statistical evaluation tested by a one-tailed *t*-test. D values between –0.2 and –0.1 are representative of a slight synergistic effect

Source: Report PC-174-2006

5.2.2　TAFの抗HBV活性に及ぼすプロテアーゼ阻害剤の影響

（試験番号 PC-320-2004、添付資料番号 4.2.1.4.1、評価資料）
（試験番号 PC-320-2006、添付資料番号 4.2.1.1.1、評価資料）

特定のウイルス PI は、CatA を強力に阻害することが明らかになっていることから［15］、HBV を安定に導入した HepAD38 細胞を用いて TAF の抗 HBV 活性に及ぼす様々な PI の影響を評価した（試験番号 PC-320-2004）。全ての PI は、臨床での C_{max} 濃度において評価した。ただし、シメプレビルは高濃度で細胞毒性を示すため、C_{max} の 25%濃度において評価を行った。4 日間の薬物処理後、細胞内 HBV DNA をリアルタイム PCR によって定量し、EC_{50} 値を求めた。

概していずれのウイルス PI 又は宿主 PI の存在下でも、TAF の EC_{50} 値に有意な変化は認められなかった（表 2.6.2- 30）。以上の結果から、検討した濃度において PI は TAF の抗 HBV 活性に対して拮抗作用を示さないことが示唆される。

表 2.6.2- 30　HepAD38 細胞でのTAFの抗HBV活性に対するCOBI及び各種PIの影響

Inhibitor Class	Drug	C_{max} (µmol/L)	EC_{50} FC from TAF alone[a, b]
HIV PI	darunavir	8.9	0.9
HCV PI	telaprevir	5.2	1.2
	boceprevir	3.3	1.3
	simeprevir	3.3[c]	0.7
CYP3A Inhibitor	cobicistat	2.2	0.9
Factor Xa Inhibitor	apixaban	0.17	0.8
	rivaroxaban	0.3	0.9
Thrombin Inhibitor	argatroban	0.4	1.0
	dabigatran	0.4	1.0
DPP4 Inhibitor	sitagliptin	1.0	0.7

C_{max} = maximum clinical concentration; EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; PI = protease inhibitor; TAF = tenofovir alafenamide; COBI = cobicistat; HBV = hepatitis B virus; HCV = hepatitis C virus; HIV = human immunodeficiency virus; CYP = cytochrome P450; DPP4 = dipeptidyl peptidase-4; FC = fold change
a　Mean fold change (FC) in TAF EC_{50} values from at least 2 independent experiments performed in quadruplicate, expressed as a ratio of the activity in the presence versus the absence of protease inhibitor.
b　EC_{50} TAF value = 138.2 nmol/L, determined from at least 2 independent experiments performed in quadruplicate.
c　Simeprevir evaluated at 25% of clinical C_{max} due to reduced cell viability observed at C_{max}, consistent with previously observed cytotoxicity (CC_{50}) values [84].
Source: Report PC-320-2004

これらの結果は、HIV-1 を感染させた初代 $CD4^+$ T 細胞の結果と異なる。$CD4^+$ T 細胞では、テラプレビル及び boceprevir の存在下において、TAF EC_{50} 値が、それぞれ 23.9 倍及び 2.9 倍に上昇した（本項 5.3.2 章）。このような差が認められた理由の 1 つとして、肝細胞では TAF 代謝の第一段階を担うのは CatA と CES1 の両者であるのに対して（2.6.4.5.1.3 項、試験番号 AD-120-2017）、PBMC においては CatA のみであるという違いが考えられる［12、13］。

HepAD38 細胞における TAF の抗 HBV 活性（EC_{50} 値）は、テラプレビル及び BNPP によって、それぞれ CatA 及び CES1 のいずれか片方のみを阻害した場合には有意な影響を受けないが、

CatA と CES1 の両者を阻害した場合のみ有意な影響を受ける（表 2.6.2- 31）（試験番号 PC-320-2006）という結果からも上記仮説が裏付けられる。以上の結果は、TAF 由来代謝物の有意な減少と相関し（本項 2.1.2.2 章）、ヒト初代肝細胞における同様の所見と一致した（本項 2.1.2.1 章）。

したがって、CatA と CES1 の両者を発現する HepAD38 細胞では、テラプレビル又は boceprevir によって CatA のみを阻害しても、TAF から TFV-DP への変換には影響を及ぼさないと考えられる。

表 2.6.2- 31　HepAD38 細胞でのTAFの抗HBV活性に対するCatA及びCES1 阻害の影響

Target (Inhibitor Class)	Inhibitor	Concentration (µmol/L)	EC_{50} FC from TAF Alone[a, b]	P-value[c]
CatA (HCV PI)	telaprevir	5.2	0.9	0.726
CES1 (n/a)	BNPP	50	1.4	0.379
CatA (HCV PI) + CES1 (n/a)	telaprevir + BNPP	5.2 + 50	2.1	0.007

BNPP = bis-p-nitrophenyl phosphate; CatA = cathepsin A, CES1 = carboxylesterase 1; EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; FC = fold change; PI = protease inhibitor; TAF = tenofovir alafenamide; n/a = not applicable; HBV = hepatitis B virus; HCV = hepatitis C virus
a　Mean fold change (FC) in TAF EC_{50} values from at least 2 independent experiments performed in duplicate, expressed as a ratio of the activity in the presence and absence of inhibitor(s).
b　Mean TAF EC_{50} value = 128.0 nmol/L, determined from at least 2 independent experiments performed in duplicate.
c　P-values compared mean TAF EC_{50} value in the presence versus the absence of inhibitor(s) using a two-tailed Student's *t* test, assuming equal variance.
Source: Report PC-320-2006.

5.3　併用による*in vitro*抗HIV活性

5.3.1　TAF及び抗レトロウイルス薬との併用による抗HIV活性

（試験番号 PC-120-2002、添付資料番号 4.2.1.4.2、評価資料）

HIV-1_{IIIB} 感染 MT-2 細胞において、一連の抗 HIV 薬（NtRTI、NRTI、NNRTI、INSTI 及び PI）と併用したときの TAF の抗 HIV-1 活性を評価した（試験番号 PC-120-2002）。5 日間の薬物処理後、ウイルスによる細胞変性作用の抑制効果を定量した。Bliss Independence モデル（MacSynergy II ソフトウェア）に基づきデータを解析した［80、81］。

TAFとTFVはいずれも細胞内TFV-DP濃度を上昇させるため、それらを併用すると、予想していた通り、相加的な抗ウイルス効果が得られた（表 2.6.2- 32）。TAF及び検討したNRTI又はNNRTIの併用によっていずれも弱～強度の相乗効果が得られた。また、TAFとPI、又はINSTIの併用で、それぞれ中程度又は強度の相乗効果が得られた。抗ウイルス活性のないブースターであるCOBIとTAFの併用により、予想通りの相加効果が得られた。検討した全ての薬物とTFVとの併用を評価したところ（データ省略）、TAFの結果及びTFVに関するこれまでの報告［85］と同等の効果が得られた。また、全ての対照薬の併用により予想された相加効果、相乗効果、及び拮抗作用が認められた。検討したいずれの薬物併用においても、細胞毒性又は拮抗作用は認められなかった。

表 2.6.2- 32　TAF及び抗レトロウイルス薬との併用による抗HIV活性

Drug combination	Class	Volume [(μmol/L)^2%]		Net Effect[b]
		Synergy[a]	Antagonism[a]	
TAF + TFV	NtRTI	24	−14	Additive
TAF + FTC	NRTI	131	−9	Strong synergy
TAF + EFV	NNRTI	100	−7	Strong synergy
TAF + NVP	NNRTI	41	−14	Minor synergy
TAF + EVG	INSTI	271	−9	Strong synergy
TAF + RAL	INSTI	205	−10	Strong synergy
TAF + DTG	INSTI	179	−10	Strong synergy
TAF + ATV	PI	96	−10	Moderate synergy
TAF + DRV	PI	56	−12	Moderate synergy
TAF + COBI	PK enhancer	17	−22	Additive
TAF + TAF	Control	20	−17	Additive
ddI + RBV	Control	302	−20	Strong synergy
d4T +RBV	Control	20	−340	Strong antagonism

ATV = atazanavir; COBI = cobicistat; d4T = stavudine; ddI = didanosine; DRV = darunavir; DTG = dolutegravir; EFV = efavirenz; EVG = elvitegravir; FTC = emtricitabine; NVP = nevirapine; RAL = raltegravir; RBV = ribavirin; TAF = tenofovir alafenamide; TFV = tenofovir; HIV = human immunodeficiency virus
a　Mean synergy and antagonism volumes at 95% confidence interval [(μmol/L)^2%] from at least 3 independent experiments performed in triplicate.
b　Net effect as defined by Prichard et al. [80, 81]. Synergy volumes of ≥ -25 to < 25 (μmol/L)^2% indicate an additive effect; ≥ 25 to < 50 (μmol/L)^2% indicate minor synergy; ≥ 50 to < 100 (μmol/L)^2% indicate moderate synergy; ≥ 100 (μmol/L)^2% indicates strong synergy. Antagonism volumes of ≥ −50 to < −25 indicate minor antagonism, ≥ −100 to < −50 indicate moderate antagonism, and < −100 indicates strong antagonism.
Source: Report PC-120-2002

5.3.2　TAFの抗HIV活性に及ぼすPIの影響

（試験番号 PC-120-2001、添付資料番号 4.2.1.1.2、評価資料）

特定のウイルス PI は、CatA を強力に阻害することが明らかになっていることから［15］、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を含む VSV-G 偽型 HIV-1_{NL4-3} 感染ヒト初代 $CD4^+$ T リンパ球において、TAF の抗 HIV 活性に及ぼす各種 PI の影響を評価した（試験番号 PC-120-2001、［16］）。臨床での C_{max} 濃度の PI 存在下／非存在下において、3 日間処理後の TAF の抗ウイルス活性（インテグレーション抑制作用、EC_{50}）を測定した。

表 2.6.2- 33 に示すように、TAF の抗ウイルス活性は、テラプレビル又は boceprevir の存在下で、それぞれ 1/23.9 及び 1/2.9 に有意に低下したが、TDF の活性は低下しなかった。この結果と一致して、酵素的解析でテラプレビル及び boceprevir は、いずれも CatA を介した TAF 活性化を強力に阻害した（本項 2.1.2.4 章）。検討した HIV PI、宿主セリン PI 又は他の HCV PI は、TAF 又は TDF の抗ウイルス活性に影響を及ぼさなかった。

以上より、検討した既存の PI と TAF の併用は、テラプレビル又は boceprevir との併用を除いて、TAF の臨床薬理及び TFV への細胞内変換に悪影響を及ぼさないことが裏付けられる。

表 2.6.2- 33　ヒト初代CD4$^+$ Tリンパ球におけるTAFの抗HIV活性に対するCOBI及び各種PIの影響

Inhibitor Class	Drug	C_{max} (µmol/L)	EC_{50} FC from TAF alone[a]	
			TAF[b]	TDF[b]
HIV PI	darunavir	8.9	0.9	1.4
	atazanavir	6.3	1.1	1.5
HCV PI	telaprevir	5.2	23.9	1.6
	boceprevir	3.3	2.9	1.3
	simeprevir	13.3	1.1	1.7
CYP3A Inhibitor	cobicistat	2.2	0.9	1.8
Factor Xa Inhibitor	apixaban	0.2	1.7	1.1
	rivaroxaban	0.3	1.2	1.2
Thrombin Inhibitor	argatroban	0.3	1.6	1.3
	dabigatran	0.15	1.4	1.2
DPP4 Inhibitor	sitagliptin	0.9	1.5	1.0

C_{max} = maximum clinical concentration; EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; FC = fold change; PI = protease inhibitor; TAF = tenofovir alafenaminde; TDF = tenofovir disoproxil fumarate; HIV = human immunodeficiency virus; HCV = hepatitis C virus; CYP = cytochrome P450; DPP4 = dipeptidyl peptidase-4

a　Mean fold change (FC) in TAF and TDF EC_{50} values from at least 4 donors performed in triplicate, expressed as a ratio of the activity in the presence versus the absence of protease inhibitor.

b　EC_{50} value (TAF) = 5.6 nmol/L; EC_{50} value (TDF) = 3.1 nmol/L, determined from at least 4 donors assayed in triplicate. Source: Report PC-120-2001

5.4　併用による*in vitro*抗HCV活性

5.4.1　抗ウイルス薬の抗HCV活性に及ぼすTAFの影響

（試験番号 PC-320-2001、添付資料番号 4.2.1.4.3、評価資料）

共有結合型 HCV PI（NS3）であるテラプレビル及び boceprevir は、酵素的解析において CatA を介した TAF 活性化を阻害し（本項 2.1.2.4 章、［16］）、HIV-1 感染のヒト初代 CD4$^+$ T リンパ球において TAF の効力を低下させることが明らかになっている（本項 5.3.2 章）。併用時の相互作用を検討するため、HCV ジェノタイプ 1a Huh-7 レプリコン細胞において、TAF（1 µmol/L）存在下／非存在下での処理 3 日間後の HCV PI（NS3）の抗 HCV 活性及び細胞毒性を評価した（試験番号 PC-320-2001）。さらに、その他の非直接作用型及び直接作用型抗 HCV 薬に及ぼす TAF の影響も評価した。

表 2.6.2- 34 に示すように、TAF は、検討したいずれの抗 HCV 薬の EC_{50} 値及び CC_{50} 値に有意な影響を与えなかった。以上の結果は、HCV PI（NS3）であるテラプレビル及び boceprevir の活性は CatA 活性に依存しないため、TAF の影響を受けないというエビデンスと一致する。

表 2.6.2- 34　HCVジェノタイプ 1aレプリコン細胞における直接／非直接作用型抗HCV薬の抗HCV活性及び細胞毒性に対するTAFの影響

HCV Inhibitor Class (Target)	Compound	Incubation with 1 µmol/L TAF		
		EC_{50} (nmol/L)[a, b]	FC EC_{50} from Drug Alone[c]	CC_{50} (nmol/L)[a]
Non-Direct Acting Antivirals				
Not Applicable	interferon-α	3.7	1.3	>122
	ribavirin	13836	1.0	>1412320
Direct Acting Antivirals				
PI (NS3)	telaprevir	1013	1.0	>89600
	boceprevir	622	1.0	>56750
	simeprevir	12.5	0.9	>1080
NI (NS5B)	sofosbuvir	66.9	1.3	>3400
(NS5A)	ledipasvir	0.05	0.8	>2.5
	GS-5816	0.01	0.9	>1.1

CC_{50} = concentration inhibiting cell growth by 50%; EC_{50} = concentration inhibiting viral replication by 50%; FC = fold change; HCV = hepatitis C virus; NI = nucleos(t)ide inhibitor; NS = non-structural protein; TAF = tenofovir alafenaminde; PI = protease inhibitor

a　Interferon-α value is in U/mL.

b　Mean EC_{50} values for ribavirin, telaprevir, boceprevir, simeprevir, sofosbuvir, ledipasvir, and GS-5816 were 13929, 1054, 648, 13.5, 50.6, 0.06, and 0.011 nmol/L, respectively. Mean EC_{50} value for interferon-α is 2.8 U/mL.

c　Mean fold change (FC) in drug EC_{50} values from at least 2 independent experiments performed in quadruplicate, expressed as a ratio of the activity in the presence versus the absence of TAF.

Source: Report PC-320-2001

6　考察及び結論

6.1　効力を裏付ける試験

TAF は、TFV の第一世代プロドラッグである TDF よりも血漿中の安定性が高い TFV のプロドラッグである。標的細胞において、TAF は速やかに加水分解されて TFV-Ala となり、続いてリン酸化されて活性代謝物である TFV-DP となる。TFV-DP は HBV RT 及び HIV-1 RT の阻害剤であり、逆転写中にウイルスの DNA 鎖の伸長を終結させる［10、4、3］。臨床的には、TDF と比較して、TAF の代謝により TFV-DP の細胞内濃度が上昇し、TFV の血中濃度は低下する（2.7.2.2.3.1.1 項）［9、11］。

ヒト初代肝細胞（HBV の標的）で TAF は主に CES1 によって加水分解され、CatA の寄与は小さいことが示唆された［13、5］。肝細胞株では CES1 の発現が抑制されているため、TAF の加水分解において CatA はより主要な役割を果たすと考えられるが、CatA 及び CES1 のどちらともヒト初代肝細胞及び肝細胞株での TAF の加水分解に関与している［5、14、15］。TFV は細胞内で 2 度のリン酸化を受けて活性代謝物に変換される［1、2］。

CatA による TAF 活性化に対する PI の潜在的な影響を検討した［16］。ヒト初代肝細胞では、テラプレビル及び boceprevir とも TFV-DP の生成に影響を与えなかったが、HepG2 細胞において、テラプレビルは TFV-DP の生成を 2.2 倍阻害した。生化学的解析の結果から、共有結合性抗 HCV PI であるテラプレビル及び boceprevir のみが CatA による TAF の加水分解を強力に阻害することが示され、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.3 及び 0.2 µmol/L であった。これらのデータから、テラプレビル及び boceprevir を除いて、今回検討した PI を TAF と併用投与してもその臨床薬理作用及び TFV-DP への細胞内変換に影響を及ぼさないことが示唆された。

TAF は受動輸送を介した膜透過性が高いため、標的細胞内に入ることが可能であるが、肝取り込みトランスポーターOATP1B1 及び OATP1B3 の基質でもある［5］。ヒト初代肝細胞、PBMC 及び $CD4^+$ T 細胞サブセットにおいて、臨床用量の TAF は効率的に取り込まれ、TFV-DP に代謝された。ヒト初代骨芽細胞では、PBMC と比較して TAF の選択的な取り込みは認められなかった。ヒト初代肝細胞における TFV-DP の $t_{1/2}$ は、約 95 時間であった［3］。これらの結果は、HepG2 細胞において、抗 HBV 活性が 24 時間を超えて持続したことと一致する［17］。

In vitro 試験と同様に、アカゲザルにおいて TFV は PBMC に効率的に取り込まれ、活性代謝物 TFV-DP に代謝された。このとき、TFV-DP の細胞内濃度は最大で 0.897 µmol/L に達した。サル PBMC における TFV-DP の $t_{1/2}$ は 48 時間を超え、投与 48 時間後のリンパ節において、十分な濃度の TFV 及び TFV-DP が認められた。ビーグル犬を用いた TAF の単回及び反復経口投与試験を実施し、肝臓中の主な代謝物は TFV-DP であることが示された。また、単回投与 4.0 時間後の C_{max} は 126 µmol/L、反復投与 7 日目の投与 4 及び 24 時間後の濃度はそれぞれ 242 及び 153µmol/L であった。TFV-DP の細胞内 $t_{1/2}$ が十分長いことから、TAF の 1 日 1 回投与の妥当性が裏付けられた。

TFV-DP は、組換え型 HBV pol/RT 及び HIV-1 RT の DNA 重合活性を効率的に阻害する［3、4］。TFV-DP は dATP と競合して DNA へ取り込まれ、TFV-DP には 3 位水酸基がないため、新生 DNA 鎖に取り込まれると DNA 合成が停止する［10］。

TAF は、*in vitro* 及び *in vivo* において HBV 活性を強力かつ選択的に阻害した。TAF は HepG2 細胞において、野生型ジェノタイプ A～H の HBV 臨床分離株に対して同程度の抗 HBV 活性を示し、全株の平均 EC_{50} は 86.6 nmol/L であった。TAF は検討した最高濃度まで細胞傷害性を示さず、HepG2 細胞における抗 HBV 活性に対する選択性は>513 倍であった。

WHV 感染ウッドチャックに対する TDF の抗ウイルス作用を、4 週間［26］又は 48 週間の反復経口投与により検討した。いずれの試験においても、TDF の経口投与により血清中 WHV DNA 量は有意に減少した。

TDF を含むレジメンで治療を受けた B 型慢性肝炎患者において、TDF 耐性に関連した HBV pol/RT 変異は確認されていない。ウイルスが持続的に増殖可能な確立した組織培養系がなかったため、TAF に対する *in vitro* 耐性発現試験は実施していない。

HepG2 細胞において、TAF は LAM-R（3/3 株）及び ETV-R（3/3 株）変異体並びにほとんどの ADV-R（4/5 株）変異体に対して強力な抗 HBV 活性を示した。二重変異（rtA181V + rtN236T）を有する ADV-R に対する TAF の *in vitro* 活性は 1/3.7 に減弱した。

6.2　副次的薬理試験

ほ乳類 DNA ポリメラーゼα、β、δ、ε及び mtDNA ポリメラーゼγに対する TFV-DP の阻害作用は極めて弱かった［4、21］。さらに、TDF 及び TFV はリガンドの様々な宿主標的タンパク質に対する結合を阻害及び活性化しなかった。

TAF（及び／又は TFV）の肝細胞株（HepG2 細胞）、静止期及び分裂期の PBMC、T リンパ芽球様細胞株（MT-2 及び MT-4 細胞）、SkMC 細胞、ヒト初代骨芽細胞並びに初代ヒト RPTEC に対する細胞傷害性は弱かった。また、TAF はヒトの赤血球前駆細胞及び骨髄前駆細胞の増殖にほとんど影響を及ぼさなかった。

TFV とは異なり、TAF は腎トランスポーターOAT1 又は OAT3 と相互作用せず、これらのトランスポーターの基質ともならないことが示唆された。また、これらのトランスポーターを発現したヒト腎上皮細胞で、OAT 依存的な細胞傷害性を示さなかった［44］。したがって、TAF が能動的（OAT 依存的）に腎近位尿細管に蓄積する可能性は低く、TAF を投与した患者では TDF と比較して循環血中 TFV 濃度が低く、TAF の腎臓に対する安全性プロファイルは TDF よりも改善している可能性が示唆される（2.7.4.2.1.5 項）。

いくつかの NRTI がミトコンドリア毒性を引き起こしうるが、TAF は 1.0 μmol/L まで HepG2 の mtDNA 量に、TFV は 300 μmol/L まで HepG2、SkMC 及び RPTEC の mtDNA 量に顕著な影響を及ぼさなかった。また、TFV はチトクローム *c* 酸化酵素の COX II 及び COX IV サブユニットの細胞発現、細胞内の脂質蓄積並びに乳酸産生に影響を及ぼさなかった。したがって、TAF が mtDNA 合成を阻害し、NRTI 関連のミトコンドリア毒性を引き起こす可能性は低い。

In vitro 抗ウイルス活性試験の結果から、TAF は免疫不全ウイルス（HIV-1、HIV-2、及び SIV）に対しても特異性の高い抗ウイルス薬であることが示され、その他のウイルス病原体（アデノウイルス、2 型デング熱ウイルス、インフルエンザ A 型ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、RSV、コクサッキーB 群ウイルス、ライノウイルス、HSV-1、HSV-2、HCMV、VZV、ワクニシアウイルス、及び HCV など）に対しては、有意な *in vitro* 活性を示さなかった。

ヒト初代 PBMC において、TAF は M 群サブタイプ A～G を含む全ての HIV-1 群（M、N、O）に対して幅広い抗 HIV 活性を示し、平均 EC_{50} 値は 0.10～12.0 nmol/L の範囲であり、全体の平均 EC_{50} 値は 3.5 nmol/L であった。TAF は HIV-2 に対しても強力な抗ウイルス活性を示し、その EC_{50} 値は 0.91～2.63 nmol/L の範囲であった。TAF の細胞傷害性は弱く、活性化 PBMC 及び T リンパ芽球様細胞株における抗 HIV 活性に対して、それぞれ 1943 及び>1997 倍の選択性を示した。

これまでに、TDF 及び TFV への耐性に関連する HIV-1 RT 変異として、K65R が同定されており［6、7］、若干 K70E も関連している［7］。TAF の HIV-1 耐性プロファイルは TFV とほぼ同様であり、TAF によって K65R±S68N が発現し、表現型として中程度 TFV 耐性が認められ、培養時間を延長してもさらなる耐性は認められなかった。さらに、既存の TFV 耐性変異（K65R、3TAM、及び Q151Mcpx）を有する変異株において、TAF 又は TFV による 6 ヵ月間の耐性発現試験後に観察されたウイルスの変異及び表現型変化は限られたものであったことから、これらのウイルスには別の耐性経路はないことが示唆された。最後に、生理的濃度の TAF 存在下で行ったウイルスブレイクスルー実験では、既存の TFV 耐性変異を有するほとんどのウイルスにおいて、ブレイクスルーが抑制された。以上の結果から、TAF 投与によって既存の TDF 耐性ウイルスに対して抗ウイルス作用が得られることが示唆される。

幅広いヌクレオシ（チ）ド耐性変異を有する一連の HIV-1 臨床分離株を用いた薬剤感受性解析において、TAF はこれらの変異株に対しても感受性を示し、抗ウイルス作用が確認された。この一連の HIV-1 変異株における TAF の抗ウイルス作用への感受性は、TFV とほぼ同様であり、TFV と TAF の EC_{50} FC には決定係数値 0.97 の強い相関が認められた。

6.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験では、TAF がラットの中枢神経系及び腎臓系、並びにイヌの心血管系に影響を及ぼさないことが示された。ラットに TAF（モノフマル酸塩）1000 mg/kg を投与すると胃排出の低下が認められたが、100 mg/kg では認められなかった。TAF の追加安全性薬理試験は不要と考えられる。

TAF は安全性薬理試験で、重要臓器系に対してほとんど影響を及ぼさなかった。イヌ 39 週間経口投与毒性試験の TAF（モノフマル酸塩）18/12 mg/kg/日投与群で、PR 間隔を延長する可能性がある程度認められたが、これらの変化は体重増加量の減少、骨及び腎毒性並びに血清 T3 の低値を伴っていた［73、74］。最高用量 100 mg/kg まで検討した心血管系の安全性薬理試験及び thorough QT 試験（2.7.2.2.2.1.1 項）では、TAF 投与による PR 延長及び ECG のいかなる変化も認められなかった。

6.4　薬力学的薬物相互作用

In vitro 相互作用試験では、TFV と FTC との併用により抗 HBV 活性の相加効果～軽微な相乗効果を示し、また LAM、ETV、TBV 及び AFV との併用により相加的抗 HBV 活性を示した。

いくつかのウイルス PI は CatA の強力な阻害剤であることが示されている［15］。CatA 及び CES1 を発現する HepAD38 細胞において、各種 PI は TAF の抗 HBV 活性に有意な影響を及ぼさなかった。CatA を発現するヒト初代 $CD4^+$ T 細胞では、テラプレビル及び boceprevir によって TAF の抗 HIV-1 活性がそれぞれ 1/23.9 及び 1/2.9 に低下した。HCV ジェノタイプ 1a Huh-7 レプリコン細胞において、TAF は様々な非直接作用型及び直接作用型抗ウイルス薬の抗 HCV 活性に有意な影響を及ぼさなかった。

更に、TAF は TFV 又は COBI との併用で相加的な抗 HIV 活性を示し、NRTI 又は NNRTI との併用で弱～強度の相乗的抗 HIV 活性を示した。また、PI との併用において中程度の相乗的抗 HIV 活性を示し、INSTI との併用において強い相乗的抗 HIV 活性を示した。

6.5　結論

TAF の一連の非臨床薬力学的評価により、慢性 B 型肝炎治療における TAF の有効性が裏付けられた。

7　参考文献

1 Eisenberg EJ, He G-X, Lee WA. Metabolism of GS-7340, a novel phenyl monophosphoramidate intracellular prodrug of PMPA, in blood. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2001;20 (4-7):1091-8. (4.3.30)

2 Robbins BL, Wilcox CK, Fridland A, Rodman JH. Metabolism of tenofovir and didanosine in quiescent or stimulated human peripheral blood mononuclear cells. Pharmacotherapy 2003;23 (6):695-701. (4.3.91)

3 Delaney WE, IV, Ray AS, Yang H, Qi X, Xiong S, Zhu Y, et al. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. Antimicrob Agents Chemother 2006;50 (7):2471-7. (4.3.24)

4 Cherrington JM, Allen SJW, Bischofberger N, Chen MS. Kinetic interaction of the diphosphates of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine and other anti-HIV active purine congeners with HIV reverse transcriptase and human DNA polymerases α, β, and γ. Antivir Chem Chemother 1995;6 (4):217-21. (4.3.18)

5 Murakami E, Wang T, Park Y, Hao J, Lepist E-I, Babusis D, et al. Implications of Efficient Hepatic Delivery by Tenofovir Alafenamide (GS-7340) for Hepatitis B Virus Therapy. Antimicrob Agents Chemother 2015;59 (6):3563-9. (4.3.75)

6 McColl DJ, Margot NA, Wulfsohn M, Coakley DF, Cheng AK, Miller MD. Patterns of resistance emerging in HIV-1 from antiretroviral-experienced patients undergoing intensification therapy with tenofovir disoproxil fumarate. J Acquir Immune Defic Syndr 2004; 37(3):1340-50. (4.3.66)

7 Margot NA, Lu B, Cheng A, Miller MD. Resistance development over 144 weeks in treatment-naive patients receiving tenofovir disoproxil fumarate or stavudine with lamivudine and efavirenz in Study 903. HIV Med 2006;7 (7):442-50. (4.3.60)

8 Margot NA, Johnson A, Miller MD, Callebaut C. Characterization of HIV-1 Resistance to Tenofovir Alafenamide In Vitro. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(10):5917-24. (4.3.59)

9 Robbins BL, Srinivas RV, Kim C, Bischofberger N, Fridland A. Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside

phosphonate 9-*R*-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), Bis(isopropyloxymethylcarbonyl) PMPA. Antimicrob Agents Chemother 1998;42 (3):612-7. (4.3.90)

10 Yokota T, Konno K, Shigeta S, Holý A, Balzarini J, De Clercq E. Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogues of hepatitis B virus DNA synthesis in HB611 cells. Antivir Chem Chemother 1994;5 (2):57-63. (4.3.102)

11 Ruane PJ, DeJesus E, Berger D, Markowitz M, Bredeek UF, Callebaut C, et al. Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of tenofovir alafenamide as 10-day monotherapy in HIV-1-positive adults. J Acquir Immune Defic Syndr 2013;63 (4):449-55. (4.3.93)

12 Birkus G, Wang R, Liu X, Kutty N, MacArthur H, Cihlar T, et al. Cathepsin A is the major hydrolase catalyzing the intracellular hydrolysis of the antiretroviral nucleotide phosphonoamidate prodrugs GS-7340 and GS-9131. Antimicrob Agents Chemother 2007;51 (2):543-50. (4.3.11)

13 Birkus G, Kutty N, He GX, Mulato A, Lee W, McDermott M, et al. Activation of 9-[(R)-2-[[(S)-[[(S)-1-(Isopropoxycarbonyl)ethyl]amino] phenoxyphosphinyl]-methoxy]propyl]adenine (GS-7340) and other tenofovir phosphonoamidate prodrugs by human proteases. Mol Pharmacol 2008;74 (1):92-100. (4.3.9)

14 Yang J, Shi D, Yang D, Song X, Yan B. Interleukin-6 alters the cellular responsiveness to clopidogrel, irinotecan, and oseltamivir by suppressing the expression of carboxylesterases HCE1 and HCE2. Mol Pharmacol 2007;72 (3):686-94. (4.3.83)

15 Murakami E, Tolstykh T, Bao H, Niu C, Steuer HM, Bao D, et al. Mechanism of activation of PSI-7851 and its diastereoisomer PSI-7977. J Biol Chem 2010;285 (45):34337-47. (4.3.74)

16 Birkus G, Bam RA, Willkom M, Frey CR, Tsai L, Stray KM, et al. Intracellular Activation of Tenofovir Alafenamide and the Effect of Viral and Host Protease Inhibitors. Antimicrob Agents Chemother. 2016; 60 (1):316-22. (4.3.7)

17 Ying C, De Clercq E, Neyts J. Lamivudine, adefovir and tenofovir exhibit long-lasting anti-hepatitis B virus activity in cell culture. J Viral Hepat 2000;7 (1):79-83. (4.3.89)

18 Lee WA, He G-X, Eisenberg E, Cihlar T, Swaminathan S, Mulato A, et al. Selective intracellular activation of a novel prodrug of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor tenofovir leads to preferential distribution and accumulation in lymphatic tissue. Antimicrob Agents Chemother 2005;49 (5):1898-906. (4.3.53)

19 Gilead Sciences Inc. VIREAD® (tenofovir disoproxil fumarate) tablets, for oral use; VIREAD® (tenofovir disoproxil fumarate) powder, for oral use. U.S. Prescribing Information. Foster City, CA. Revised October 2013. (4.3.37)

20 Gilead Sciences International Limited. Viread 245 mg film-coated tablets: Summary of Product Characteristics. United Kingdom. Updated December 2014. (4.3.38)

21 Kramata P, Birkus G, Otmar M, Votruba I, Holy A. Structural features of acyclic nucleotide analogs conferring inhibitory effects on cellular replicative DNA polymerases. Collection Symposium Series (Holy A and Tocik Z, eds), Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of Czech Republic, Prague, Czech Republic 1996;1:188-91. (4.3.51)

22 Birkus G, Hitchcock MJM, Cihlar T. Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treated with tenofovir: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 2002;46 (3):716-23. (4.3.8)

23 Toh H, Hayashida H, Miyata T. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. Nature 1983;305:827-9. (4.3.107)

24 Jones SA, Hu J. Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention. Emerging microbes & infections 2013;2 (9):e56 . (4.3.46)

25 Xiong X, Flores C, Yang H, Toole JJ, Gibbs CS. Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. Hepatology 1998;28 (6):1669-73. (4.3.76)

26 Menne S, Cote PJ, Korba BE, Butler SD, George AL, Tochkov IA, et al. Antiviral effect of oral administration of tenofovir disoproxil fumarate in woodchucks with chronic woodchuck hepatitis virus infection. Antimicrob Agents Chemother 2005;49 (7):2720-8. (4.3.67)

27 Kitrinos KM, Corsa A, Liu Y, Flaherty J, Snow-Lampart A, Marcellin P, et al. No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate after 6 years of therapy in patients with chronic hepatitis B. Hepatology 2014;59(2):434-42. (4.3.50)

28 Zeisel MB, Lucifora J, Mason WS, Sureau C, Beck J, Levrero M, et al. Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions-report of the ANRS workshop on HBV cure. Gut 2015;64 (8):1314-26. (4.3.106)

29 Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, et al. Long-term Therapy With Adefovir Dipivoxil for HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B for up to 5 Years. Gastroenterology 2006;131 (6):1743-51. (4.3.40)

30 Lok ASF, Lai C-L, Leung N, Yao G-B, Cui Z-Y, Schiff ER, et al. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology 2003;125 (6):1714-22. (4.3.56)

31 Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, et al. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy. Hepatology 2009;49 (5):1503-14. (4.3.105)

32 Liaw YF, Gane E, Leung N, Zeuzem S, Wang Y, Lai CL, et al. 2-Year GLOBE trial results: telbivudine Is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology 2009;136 (2):486-95. (4.3.54)

33 van Bommel F, de Man RA, Wedemeyer H, Deterding K, Petersen J, Buggisch P, et al. Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. Hepatology 2010;51 (1):73-80. (4.3.96)

34 Qi X, Xiong S, Yang H, Miller M, Delaney WE, IV. In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents. Antivir Ther 2007;12 (3):355-62. (4.3.86)

35 Yang H, Qi X, Sabogal A, Miller M, Xiong S, Delaney WE, IV. Cross-resistance testing of next-generation nucleoside and nucleotide analogues against lamivudine-resistant HBV. Antivir Ther 2005;10 (5):625-33. (4.3.81)

36 Patterson SJ, George J, Strasser SI, Lee AU, Sievert W, Nicoll AJ, et al. Tenofovir disoproxil fumarate rescue therapy following failure of both lamivudine and adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B. Gut 2011;60:247-54. (4.3.79)

37 Berg T, Zoulim F, Moeller B, Trinh H, Marcellin P, Chan S, et al. Long-term efficacy and safety of emtricitabine plus tenofovir DF vs. tenofovir DF monotherapy in adefovir-experienced chronic hepatitis B patients. J Hepatol 2014;60 (4):715-22. (4.3.6)

38 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. Hepatology 2001;33 (3):751-7. (4.3.100)

39 Pisarev VM, Lee S-H, Connelly MC, Fridland A. Intracellular metabolism and action of acyclic nucleoside phoshonates on DNA replication. Mol Pharmacol 1997;52 (1):63-8. (4.3.82)

40 Cihlar T, Chen MS. Incorporation of selected nucleoside phosphonates and anti-human immunodeficiency virus nucleotide analogues into DNA by human DNA polymerases α, β and γ. Antivir Chem Chemother 1997;8 (3):187-95. (4.3.20)

41 Cihlar T, Birkus G, Greenwalt DE, Hitchcock MJM. Tenofovir exhibits low cytotoxicity in various human cell types: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Antiviral Res 2002;54 (1):37-45. (4.3.19)

42 Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, et al. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. J Am Soc Nephrol 2002;13 (4):866-74. (4.3.71)

43 Cihlar T, Ho ES, Lin DC, Mulato AS. Human renal organic anion transporter 1 (hOAT1) and its role in the nephrotoxicity of antiviral nucleotide analogs. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2001;20 (4-7):641-8. (4.3.21)

44 Bam RA, Yant SR, Cihlar T. Tenofovir alafenamide is not a substrate for renal organic anion transporters (OATs) and does not exhibit OAT-dependent cytotoxicity. Antivir Ther 2014: 19 (7): 687-92. (4.3.5)

45 Vidal F, Domingo JC, Guallar J, Saumoy M, Cordobilla B, Sanchez de la Rosa R, et al. In vitro cytotoxicity and mitochondrial toxicity of tenofovir alone and in combination with other

antiretrovirals in human renal proximal tubule cells. Antimicrob Agents Chemother 2006;50 (11):3824-32. (4.3.43)

46 Ho ES, Lin DC, Mendel DB, Cihlar T. Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1. J Am Soc Nephrol 2000;11 (3):383-93. (4.3.41)

47 Malizia AP, Vioreanu MH, Doran PP, Powderly WG. HIV1 protease inhibitors selectively induce inflammatory chemokine expression in primary human osteoblasts. Antiviral Res 2007;74 (1):72-6. (4.3.16)

48 Duvivier C, Kolta S, Assoumou L, Ghosn J, Rozenberg S, Murphy RL, et al. Greater decrease in bone mineral density with protease inhibitor regimens compared with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor regimens in HIV-1 infected naive patients. AIDS 2009;23 (7):817-24. (4.3.29)

49 Sax PE, Wohl D, Yin MT, Post F, DeJesus E, Saag M, et al. Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate, coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine, for initial treatment of HIV-1 infection: two randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trials. Lancet. 2015;385(9987):2606-15. (4.3.95)

50 Agouron Pharmaceuticals Inc. VIRACEPT® (nelfinavir mesylate) Tablets and Oral Powder. US Prescribing Information. La Jolla, CA. Revised May 2013. (4.3.2)

51 KALETRA (lopinavir/ritonavir) Tablet, Film Coated for Oral use KALETRA (lopinavir/ritonavir) Solution for Oral use. US Prescribing Information. AbbVie LTD. North Chicago, IL. Revised January 2013. (4.3.48)

52 Moyle G. Clinical manifestations and management of antiretroviral nucleoside analog-related mitochondrial toxicity. Clin Ther 2000;22 (8):911-36. (4.3.72)

53 Carr A. Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development. Nat Rev Drug Discov 2003;2 (8):624-34. (4.3.17)

54 Pan-Zhou X-R, Cui L, Zhou X-J, Sommadossi J-P, Darley-Usmar VM. Differential effects of antiretroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells. Antimicrob Agents Chemother 2000;44 (3):496-503. (4.3.78)

55 Mazzucco CE, Hamatake RK, Colonno RJ, Tenney DJ. Entecavir for treatment of hepatitis B virus displays no in vitro mitochondrial toxicity or DNA polymerase gamma inhibition. Antimicrob Agents Chemother 2008;52 (2):598-605. (4.3.65)

56 Brinkman K, Ter Hofstede HJM, Burger DM, Smeitink JAM, Koopmans PP. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. AIDS 1998;12 (14):1735-44. (4.3.14)

57 Callebaut C, Stepan G, Tian Y, Miller MD. In Vitro Virology Profile of Tenofovir Alafenamide, a Novel Oral Prodrug of Tenofovir with Improved Antiviral Activity Compared to That of Tenofovir Disoproxil Fumarate. Antimicrob Agents Chemother 2015;59(10):5909-16. (4.3.15)

58 Margot NA, Waters JM, Miller MD. In Vitro Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance Selections with Combinations of Tenofovir and Emtricitabine or Abacavir and Lamivudine. Antimicrob Agents Chemother 2006;50 (12):4087-95. (4.3.61)

59 Svarovskaia ES, Feng JY, Margot NA, Myrick F, Goodman D, Ly JK, et al. The A62V and S68G Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase Partially Restore the Replication Defect Associated With the K65R Mutation. J Acquir Immune Defic Syndr 2008;48 (4):428-36. (4.3.101)

60 Sluis-Cremer N, Sheen CW, Zelina S, Torres PS, Parikh UM, Mellors JW. Molecular mechanism by which the K70E mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 2007;51 (1):48-53. (4.3.97)

61 Kagan RM, Lee T-S, Ross L, Lloyd RM, Jr., Lewinski MA, Potts SJ. Molecular basis of antagonism between K70E and K65R tenofovir-associated mutations in HIV-1 reverse transcriptase. Antiviral Res 2007;75 (3):210-8. (4.3.47)

62 Wensing AM, Calvez V, Gunthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, et al. 2014 update of the drug resistance mutations in HIV-1. Top Antivir Med 2014;22 (3):642-50. (4.3.58)

63 Wainberg MA, Miller MD, Quan Y, Salomon H, Mulato AS, Lamy PD, et al. In vitro selection and characterization of HIV-1 with reduced susceptibility to PMPA. Antivir Ther 1999;4 (2):87-94. (4.3.52)

64 Srinivas RV, Fridland A. Antiviral activities of 9-*R*-2-phosphonomethoxypropyl adenine (PMPA) and bis(isopropyloxymethylcarbonyl)PMPA against various drug-resistant human immunodeficiency virus strains. Antimicrob Agents Chemother 1998;42 (6):1484-7. (4.3.98)

65 Miller MD, Margot NA, Lamy PD, Fuller MD, Anton KE, Mulato AS, et al. Adefovir and tenofovir susceptibilities of HIV-1 after 24 to 48 weeks of adefovir dipivoxil therapy: genotypic and phenotypic analyses of study GS-96-408. J Acquir Immune Defic Syndr 2001;27 (5):450-8. (4.3.70)

66 Wolf K, Walter H, Beerenwinkel N, Keulen W, Kaiser R, Hoffmann D, et al. Tenofovir resistance and resensitization. Antimicrob Agents Chemother 2003;47 (11):3478-84. (4.3.64)

67 Miller MD, Anton KE, Mulato AS, Lamy PD, Cherrington JM. Human immunodeficiency virus type 1 expressing the lamivudine-associated M184V mutation in reverse transcriptase shows increased susceptibility to adefovir and decreased replication capability in vitro. J Infect Dis 1999;179 (1):92-100. (4.3.68)

68 Ross L, Parkin N, Chappey C, Fisher R, St Clair M, Bates M, et al. Phenotypic impact of HIV reverse transcriptase M184I/V mutations in combination with single thymidine analog mutations on nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. AIDS 2004;18 (12):1691-6. (4.3.92)

69 Deval J, White KL, Miller MD, Parkin NT, Courcambeck J, Halfon P, et al. Mechanistic basis for reduced viral and enzymatic fitness of HIV-1 reverse transcriptase containing both K65R and M184V mutations. J Biol Chem 2004;279 (1):509-16. (4.3.27)

70 Frankel FA, Invernizzi CF, Oliveira M, Wainberg MA. Diminished efficiency of HIV-1 reverse transcriptase containing the K65R and M184V drug resistance mutations. AIDS 2007;21 (6):665-75. (4.3.34)

71 Miller MD, Margot N, Lu B, Zhong L, Chen S-S, Cheng A, et al. Genotypic and phenotypic predictors of the magnitude of response to tenofovir disoproxil fumarate treatment in antiretroviral-experienced patients. J Infect Dis 2004;189 (5):837-46. (4.3.69)

72 Petropoulos CJ, Parkin NT, Limoli KL, Lie YS, Wrin T, Huang W, et al. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. Antimicrob Agents Chemother 2000;44 (4):920-8. (4.3.80)

73 Kienle RD, Bruyette D, Pion PD. Effects of thyroid hormone and thyroid dysfunction on the cardiovascular system. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1994;24 (3):495-507. (4.3.49)

74 Tribulova N, Knezl V, Shainberg A, Seki S, Soukup T. Thyroid hormones and cardiac arrhythmias. Vascular pharmacology 2010;52 (3-4):102-12. (4.3.108)

75 Back DJ, Burger DM, Flexner CW, Gerber JG. The pharmacology of antiretroviral nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors: implications for once-daily dosing. J Acquir Immune Defic Syndr 2005;39 Suppl 1:S1-23, quiz S4-5. (4.3.4)

76 Ray AS, Myrick F, Vela JE, Olson LY, Eisenberg EJ, Borroto-Esoda K, et al. Lack of a metabolic and antiviral drug interaction between tenofovir, abacavir and lamivudine. Antivir Ther 2005;10 (3):451-7. (4.3.88)

77 Vela JE, Miller MD, Rhodes GR, Ray AS. Effect of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors of HIV on endogenous nucleotide pools. Antivir Ther 2008;13(6):789-97. (4.3.39)

78 Ray A, Olson L, Fridland A. Role of purine nucleoside phosphorylase in drug interactions between 2',3'-dideoxyinosine and allopurinol, ganciclovir or tenofovir. Antimicrob Agents Chemother 2004;48 (4):1089-95. (4.3.87)

79 Fulco PP, Kirian MA. Effect of tenofovir on didanosine absorption in patients with HIV. Ann Pharmacother 2003;37 (9):1325-8. (4.3.35)

80 Prichard MN, Aseltine KR, Shipman C, Jr. MacSynergy™ II. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 1993. (4.3.84)

81 Prichard MN, Shipman C, Jr. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. Antiviral Res 1990;14 (4-5):181-205. (4.3.85)

82 Elion GB, Singer S, Hitchings GH. Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. J Biol Chem 1954;208 (2):477-88. (4.3.31)

83 Delaney WE, IV, Yang H, Miller MD, Gibbs CS, Xiong S. Combinations of adefovir with nucleoside analogs produce additive antiviral effects against hepatitis B virus in vitro. Antimicrob Agents Chemother 2004;48 (10):3702-10. (4.3.25)

84　Lin TI, Lenz O, Fanning G, Verbinnen T, Delouvroy F, Scholliers A, et al. In vitro activity and preclinical profile of TMC435350, a potent hepatitis C virus protease inhibitor. Antimicrob Agents Chemother 2009;53 (4):1377-85. (4.3.55)

85　Mulato AS, Cherrington JM. Anti-HIV activity of adefovir (PMEA) and PMPA in combination with antiretroviral compounds: in vitro analyses. Antiviral Res 1997;36 (2):91-7. (4.3.73)

ベムリディ錠 25 mg

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.3　薬理試験概要表

ギリアド・サイエンシズ株式会社

(0000)

目次

2.6.3.1　薬理試験：一覧表 3

2.6.3.2　効力を裏付ける試験 11

2.6.3.3　副次的薬理試験 11

2.6.3.4　安全性薬理試験 12

2.6.3.5　薬理学的薬物相互作用試験 14

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表

2.6.3.1.1　　テノホビル アラフェナミド（TAF)

2.6.3.1.1.1　　効力を裏付ける試験

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No	Location in CTD
In Vitro Assessment of GS-7340 as a Substrate for Human OATP1B1 and OATP1B3	CHO cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	AD-120-2022	4.2.2.6.11
Effect of an OATP inhibitor on uptake of TAF into primary human hepatocytes	Primary human hepatocytes	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	AD-120-2042	4.2.2.6.12
Effect of Inhibitors of Cathepsin A, Carboxylesterase 1, and CYP3A4 on Metabolism of Tenofovir Alafenamide Fumarate (GS-7340) in Primary Human Hepatocytes	Primary human hepatocytes	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	AD-120-2031	4.2.2.6.7
CatA and CES1 Expression and Enzymatic Activation of TAF in HepG2 and HepAD38 Cells	HepG2 and HepAD38 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-320-2006	4.2.1.1.1
Effect of Inhibitors of HIV, HCV and Host Cell Proteases on CatA-mediated Activation and Antiretroviral Activity of Tenofovir Alafenamide	Purified CatA and primary human CD4+ T lymphocytes	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2001	4.2.1.1.2
In Vitro Activation of GS-1278, GS-4331 and GS-7340 in Primary Human Hepatocytes	Primary Human Hepatocytes	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	AD-120-2017	4.2.2.4.6
Lack of TAF Cytotoxic Effect on Primary Osteoblasts at Clinically Relevant Drug Concentrations	Primary Human Osteoblasts	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2008	4.2.1.1.3

2.6.3　薬理試験概要表
ベムリディ錠 25 mg

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No	Location in CTD
Tenofovir Alafenamide Loading in Primary Human CD4+ T Cell Subsets	Primary Human CD4+ T Cell Subsets	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2023	4.2.1.1.4
A Single Dose Pharmacokinetic and Oral Bioavailability Study of GS-7430-02 in Rhesus Monkeys	Rhesus monkeys	PO	[redacted] NV, USA, (In-life phase) [redacted], Montreal, Canada (Analysis)	P2000087	4.2.2.2.9
Plasma and Liver Pharmacokinetics of Tenofovir Alafenamide (TAF) Following Single Oral Administration in Male Beagle Dogs	Beagle dogs	PO	[redacted], Mattawan, MI, USA (In-life phase) Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA (Analysis)	AD-120-2034	4.2.2.2.8
Plasma and Liver Pharmacokinetics of Tenofovir Alafenamide (GS-7340) Following 7-Day Oral Administration in Male Beagle Dogs	Beagle dogs	PO	[redacted], Mattawan, MI, USA (In-life phase) Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA (Analysis)	AD-120-2033	4.2.2.2.10
Tenofovir Alafenamide Demonstrates Broad Cross-Genotype Activity Against Wild-type HBV Clinical Isolates In Vitro	HepG2 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-320-2003	4.2.1.1.5
Cytotoxicity Assay with TAF	MT-2, MT-4, and HepG2 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2007	4.2.1.2.2
Antiviral Activity of TAF Against Drug-Resistant HBV Isolates	HepG2 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-320-2007	4.2.1.1.6

GS-7340 and TAF = tenofovir alafenamide; CHO = Chinese Hamster Ovary; OATP = organic anion transporting polypeptide; CatA = cathepsin A; CES1 = carboxylesterase 1; CYP = cytochrome P450 ; PO = oral; HBV = hepatitis B virus

2.6.3.1.1.2　　副次的薬理試験

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No.	Location in CTD
Cytotoxicity of Tenofovir Alafenamide (GS-7340) in Resting and Dividing Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)	PBMCs	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2009	4.2.1.2.1
Cytotoxicity Assay with TAF	MT-2, MT-4, and HepG2 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2007	4.2.1.2.2
Antiviral Activity and Cytotoxicity of TAF Metabolites	MT-2 and MT-4 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2021	4.2.1.2.3
Effects of TAF on Hematopoietic Progenitor Cells	Erythroid and myeloid progenitors	*In vitro*	[redacted], Vancouver, BC, Canada	PC-120-2016	4.2.1.2.4
Cytotoxicity Assay with TAF	HEK293T cells expressing renal OAT1 and OAT3 transporters and primary human CD4+ T lymphocytes	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2018	4.2.1.2.5
Lack of TAF Cytotoxic Effect on Primary Osteoblasts at Clinically Relevant Drug Concentrations	Primary Human Osteoblasts	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2008	4.2.1.1.3
Effect of TAF on Mitochondrial DNA	HepG2 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2006	4.2.1.2.6
Mitochondrial Toxicity of Combinations of Nucleoside and Nucleotide Analogue Reverse-Transcriptase Inhibitors in HepG2 cells	HepG2 cells	*In vitro*	[redacted], Freiburg, Germany	TX-104-2001	4.2.1.2.7
Antiviral Activity of TAF and TFV Against a Panel of Animal Viruses	A panel of 18 human viruses	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2003	4.2.1.2.8

2.6.3　薬理試験概要表
ベムリディ錠 25 mg

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No.	Location in CTD
Profiling of TAF Antiviral Activity Against HIV-1 and HIV-2 Clinical Isolates in Primary Cells	PBMCs	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2004	4.2.1.2.9
Metabolism and Antiretroviral Activity of Tenofovir Alafenamide in CD4+ T Cells and Macrophages from Demographically Diverse Donors	Purified CatA, primary Human CD4+ T-lymphocytes and MDMs	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2017	4.2.1.2.10
TAF In Vitro Resistance Selection Studies with Wild-Type HIV-1 Isolates	MT-2 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2011	4.2.1.2.11
TAF In Vitro Resistance Selection Studies with TDF-Resistant HIV-1 Isolates	MT-2 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2012	4.2.1.2.12
In Vitro Evaluation of TAF Resistance Barrier	MT-2 cells	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2013	4.2.1.2.13
In Vitro Resistance Profile of TAF Against Patient-Derived Recombinant HIV-1 Isolates	Recombinant HIV-1 Clinical Isolates	*In vitro*	[redacted], South San Francisco, CA, USA	PC-120-2014	4.2.1.2.14

TAF = tenofovir alafenamide; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; OAT = organic anion transporter; HIV = human immunodeficiency virus; TDF = tenofovir disoproxil fumarate; TFV = tenofovir; MDMs = monocyte-derived macrophages

2.6.3.1.1.3　　安全性薬理試験

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No. (CRO Study No.)	Location in CTD
In vitro						
Effects of GS-7340-03 on Cloned hERG Potassium Channels Expressed in Human Embryonic Kidney Cells	Yes	Human embryonic kidney cells (HEK293)	*In vitro*	[redacted] Cleveland, OH, USA	PC-120-2005 ([redacted] 111213.DPW)	4.2.1.3.2
In vivo						
A Pharmacological Safety Assessment of the Effect of GS-7340-02 on the Central Nervous System of the Rat	Yes	Male Sprague Dawley rats	PO	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	R990188 ([redacted] 56518)	4.2.1.3.1
A Cardiovascular Profile Study Following a Single Oral Administration of GS-7340-02 in the Unrestrained Conscious Beagle Dog	Yes	Conscious male beagle dogs	PO	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	D2000006 ([redacted] 93205)	4.2.1.3.3
A Pharmacological Assessment of the Effect of GS-7340-02 on Gastrointestinal Motility in the Rat	Yes	Male Sprague Dawley rats	PO	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	R990187 ([redacted] 56519)	4.2.1.3.4
A Pharmacological Assessment of the Effect of GS-7340-02 on the Renal System of the Rat	Yes	Male Sprague Dawley rats	PO	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	R990186 ([redacted] 56520)	4.2.1.3.5

GS-7340 = tenofovir alafenamide; hERG = human ether-à-go-go-related gene; GLP = Good Laboratory Practice; PO = oral; [redacted] = [redacted] CRO = contract research organization

a　An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

2.6.3.1.1.4　　薬理学的薬物相互作用試験

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No.	Location in CTD
Effect of Protease Inhibitors on the Anti-HBV Activity of Tenofovir Alafenamide	HepAD38 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-320-2004	4.2.1.4.1
CatA and CES1 Expression and Enzymatic Activation of TAF in HepG2 and HepAD38 Cells	HepG2 and HepAD38 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-320-2006	4.2.1.1.1
Tenofovir Alafenamide Antiviral Activity in Combination with Antiretroviral Agents	MT-2 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2002	4.2.1.4.2
Effect of Inhibitors of HIV, HCV, and Host Cell Proteases on Cathepsin A-mediated Activation and Antiretroviral Activity of Tenofovir Alafenamide	Purified CatA and primary Human CD4+ T lymphocytes	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-120-2001	4.2.1.1.2
Effect of Tenofovir Alafenamide on the Activity of HCV Inhibitors	Huh-7 cells	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-320-2001	4.2.1.4.3

CatA = cathepsin A; CES1 = carboxylesterase 1; TAF = tenofovir alafenamide; HBV = hepatitis B virus; HIV = human immunodeficiency virus; HCV = hepatitis C virus

2.6.3.1.2　テノホビル ジソプロキシルフマル酸塩（TDF）及びテノホビル（TFV）

2.6.3.1.2.1　効力を裏付ける試験

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No.	Location in CTD
Intracellular Kinetics of ^{14}C-PMPA in Rhesus Monkeys	Male macaque monkeys	Subcutaneous	[redacted], Seattle, WA, USA (In-life phase) [redacted], Memphis, TN, USA (analysis)	P2001025	4.2.1.1.7
Protein binding of PMPA in human plasma and serum	Centrifugal ultrafiltration Human plasma and serum	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	P0504-00039.1	4.2.2.3.6
A 48 Week oral dosing study of adefovir dipivoxil (ADV), tenofovir disoproxil fumarate (TDF), emtricitabine (FTC), and lamivudine (3TC), alone and in combination, using the woodchuck model of hepatitis B virus infection	Woodchucks	Oral	[redacted], Ithaca, NY, USA	PC-174-2004	4.2.1.1.8

PMPA = tenofovir

2.6.3.1.2.2　副次的薬理試験

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No.	Location in CTD
Binding Screen to Neuroreceptors, Ion Channels, Transporters, Nuclear Receptors of TDF	Protein targets	*In vitro*	[redacted], Taipei, Taiwan	V2000020	4.2.1.2.15
Cytotoxicity Assay with TFV	HepG2, SKMCs, RPTECs	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	P4331-00037	4.2.1.2.16
Mitochondrial Toxicity of TFV	HepG2, SKMCs, RPTECs	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	P1278-00042	4.2.1.2.17

TDF = tenofovir disoproxil fumarate; TFV = tenofovir; SKMCs = human skeletal muscle cells; RPTECs = human renal proximal tubule epithelial cells

2.6.3.1.2.3　薬理学的薬物相互作用試験

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No.	Location in CTD
Anti-HBV Activity of TFV in Combination with Nucleoside Analogues	AD38 cell line	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA	PC-174-2006	4.2.1.4.4

HBV = hepatitis B virus; TFV = tenofovir

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験

2.6.2.2 を参照

2.6.3.3　　副次的薬理試験

2.6.2.3 を参照

2.6.3.4　安全性薬理試験

2.6.3.4.1　*In vitro* 試験

Test Article: TAF(hemifumarate)

Organ Systems Evaluated	GLP[a]	Species / Strain	Method of Administration	Dose (µmol/L)	Number per concentration	Noteworthy Finding	Gilead Study No. (CRO Study No.) / Location
Cardiovascular (hERG Inhibition)	Yes	Human embryonic kidney cells (HEK293)	*In vitro*	0, 1, and 10	3 replicates	The IC_{50} on hERG potassium current: >10 µmol/L	PC-120-2005 ([redacted] 111213.DPW) / 4.2.1.3.2

TAF = tenofovir alafenamide; hERG = human ether-a-go-go related gene; CRO = contract research organization; GLP = Good Laboratory Practice
a　An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

2.6.3.4.2　*In vivo* 試験

Test Article: TAF(monofumarate)

Organ Systems Evaluated	GLP[a]	Species / Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Gender and n per Group	Noteworthy Findings	Gilead Study No. (CRO Study No.) / Location
CNS	Yes	Rat/Sprague Dawley CD (Crl: CD®(SD)BR)	PO	0, 100, 1000 (NOEL)	M 10/group	None	R990188 ([redacted]56518) / 4.2.1.3.1
Cardiovascular	Yes	Dog/Beagle	PO	30, 100 (NOEL)	M 3/group	None	D2000006 ([redacted]93205) / 4.2.1.3.3
Gastrointestinal	Yes	Rat/Sprague Dawley CD (Crl: CD®(SD)BR)	PO	0, 100 (NOEL), 1000	M 9/group	At 1000 mg/kg, the rate of gastric emptying was reduced.	R990187 ([redacted]56519) / 4.2.1.3.4
Renal	Yes	Rat/Sprague Dawley CD (Crl: CD®(SD)BR)	PO	0, 100, 1000 (NOEL)	M 10/group	None	R990186 ([redacted]56520) / 4.2.1.3.5

TAF = tenofovir alafenamide; CNS = central nervous system; CRO = contract research organization; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NOEL = no-observed-effect level; PO = oral

a　An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

2.6.3.5　　薬理学的薬物相互作用試験

2.6.2.5 を参照