ソホスブビル／ベルパタスビル

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁

略号一覧表 4
1 緒言 5
1.1 ベルパタスビル 5
1.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 6
2 参考文献 7

図目次

頁

図 1　ベルパタスビルの構造式.....6

略号一覧表

略号	英語	日本語
EC_{50}	half maximal effective concentration or effective concentration of compound causing 50% of maximal inhibition	50%効果濃度
GS-5816	velpatasvir	ベルパタスビル
HCV	hepatitis C virus	C 型肝炎ウイルス
NS	nonstructural protein	非構造タンパク質
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸

1　緒言

本剤はソホスブビル及びベルパタスビル（GS-5816）を有効成分として含有する配合錠であり、本申請資料は慢性 C 型肝炎ウイルス（HCV）感染症の治療に対する本剤の製造販売承認申請の根拠として提出する。

ソホスブビルは、ソバルディ®錠 400 mg として平成 27 年 3 月 26 日に国内で承認された。また、平成 29 年 3 月 24 日に効能追加に係る一部変更承認申請（以下、「一変申請」）が承認された。

レジパスビル／ソホスブビル配合剤は、ハーボニー®配合錠（レジパスビル 90 mg 及びソホスブビル 400 mg）として平成 27 年 7 月 3 日に国内で承認された。また、平成 30 年 2 月 16 日に効能追加に係る一変申請が承認された。

ソホスブビルの非臨床試験データは、ソバルディ®錠及びハーボニー®配合錠の承認及び一変申請時に提出済みであり、CTD 2.4 及び CTD 2.6 に要約した。本申請資料では、ソホスブビル、ベルパタスビル、ソホスブビルとベルパタスビルの併用投与、及び本剤を用いた新規の非臨床試験については詳述し、関連する既提出のソホスブビル非臨床試験については必要に応じて再提出する。

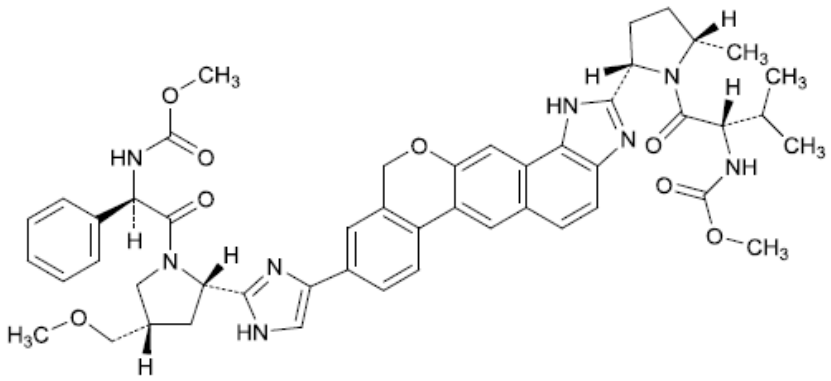
ベルパタスビルを用いた一連の非臨床試験を実施し、試験結果を 2.6 項に示す。ベルパタスビル及び本剤の詳細な評価を進めるため、各単剤及び本剤による非臨床ウイルス学的試験について 2.5.4 項で考察し、臨床ウイルス学的試験結果とともにその詳細を 2.7.2.4.1 項に示す。非臨床試験の報告書を第 4 部及び第 5 部に示す。

1.1　ベルパタスビル

HCV の非構造タンパク質（NS）5A はウイルスリボ核酸（RNA）複製［1］及び HCV 粒子形成［2、3］に必須である。また、NS5A は多数の宿主タンパク質と相互作用し［4］、宿主の自然免疫応答を回避することで感染を促進すると考えられる［5］。

ベルパタスビル（{(2*S*)-1-[(2*S*,5*S*)-2-(9-{2-[(2*S*,4*S*)-1-{(2*R*)-2-[(メトキシカルボニル)アミノ]-2-フェニルアセチル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-2-イル]-1*H*-イミダゾール-4-イル}-1,11-ジヒドロ[2]ベンゾピラノ[4',3':6,7]ナフト[1,2-*d*]イミダゾール-2-イル)-5-メチルピロリジン-1-イル]-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル}カルバミン酸メチル）は、*in vitro* において HCV RNA 複製を強力に阻害する新規の HCV NS5A 阻害剤であり、その平均 50%効果濃度（EC_{50}）値は 0.002～0.13 nmol/L の範囲である。図 1 にベルパタスビルの構造式を示す。交差耐性及び *in vitro* 耐性発現試験結果、*in vivo* 耐性プロファイル並びに HCV 関連酵素に対して阻害作用を示さないことから、ベルパタスビルの作用機序として NS5A を標的とすることが裏付けられている。

図 1　ベルパタスビルの構造式



1.2　　ソホスブビル／ベルパタスビル

ソホスブビルは、*in vitro* において HCV RNA 複製を強力に阻害する HCV NS5B ポリメラーゼ阻害剤である。ソホスブビル及びベルパタスビルはどちらも単剤として HCV ジェノタイプ 1～6 に対して強い抗ウイルス活性を示す。ソホスブビルとベルパタスビルの併用により相加的な *in vitro* 抗ウイルス活性を示した。ソホスブビルとベルパタスビルの併用試験において、抗ウイルス作用に対する拮抗作用は認められず、細胞生存率にも有意な変化は認められなかった。ソホスブビルに対する感受性低下を示す NS5B S282T 変異レプリコンはベルパタスビルに対して十分な感受性を示した。同様に、ベルパタスビルに対して感受性低下を示した一連の NS5A 変異体に対してソホスブビルは十分な活性を示した。以上より、ソホスブビル及びベルパタスビルの両薬剤間に *in vitro* 抗ウイルス活性に対する相加的な相互作用があること及び *in vitro* 交差耐性がないことから、本剤は臨床で強力な抗 HCV 活性及び有益な耐性プロファイルを示すことが期待される。

本申請資料に記載した非臨床試験結果は、HCV 感染症の治療に使用する本剤（ソホスブビル 400 mg 及びベルパタスビル 100 mg）の好ましいベネフィットーリスクプロファイルを裏付けるものである。本剤の申請効能・効果、用法・用量に関する詳細は 2.5 項に記載した。

2　参考文献

1　Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. J Virol 2001;75 (3):1252-64.

2　Hughes M, Griffin S, Harris M. Domain III of NS5A contributes to both RNA replication and assembly of hepatitis C virus particles. J Gen Virol 2009;90 (Pt 6):1329-34.

3　Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. PLoS pathogens 2008;4 (3):e1000032.

4　Macdonald A, Harris M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. J Gen Virol 2004;85 (Pt 9):2485-502.

5　Freundt EC, Lenardo MJ. Interfering with interferons: Hepatitis C virus counters innate immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102 (49):17539-40.

ソホスブビル／ベルパタスビル

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁
略号一覧表 4
1 まとめ 5
1.1 ベルパタスビル 5
1.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 6
2 効力を裏付ける試験 7
2.1 ベルパタスビル 7
2.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 7
3 副次的薬理試験 8
3.1 ベルパタスビル 8
3.1.1 HCV 以外のウイルスに対する活性 8
3.1.2 *In Vitro* 細胞毒性 8
3.1.3 *In Vitro* 受容体結合試験 8
3.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 9
4 安全性薬理試験 10
4.1 ベルパタスビル 10
4.1.1 中枢神経系に対する作用 10
4.1.2 心血管系に対する作用 10
4.1.2.1 *In Vitro* 10
4.1.2.2 *In Vivo* 11
4.1.3 呼吸器系に対する作用 11
4.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 11
5 薬力学的薬物相互作用試験 12
6 考察及び結論 13
6.1 ベルパタスビル 13
6.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 13
7 表 14
8 参考文献 15

表目次

頁
表 1　各種細胞株におけるベルパタスビル 5 日間処理後の細胞毒性.....8

略号一覧表

略号	英語	日本語
BVDV	bovine viral diarrhea virus	牛ウイルス性下痢ウイルス
CC_{50}	drug concentration that results in a 50% reduction in cell viability	50%細胞毒性濃度
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EC_{50}	half maximal effective concentration or effective concentration of compound causing 50% of maximal inhibition	50%効果濃度
ECG	electrocardiogram	心電図
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GS-5816	velpatasvir	ベルパタスビル
HBV	hepatitis B virus	B 型肝炎ウイルス
HCV	hepatitis C virus	C 型肝炎ウイルス
HepG2	human hepatocellular carcinoma cell line	ヒト肝細胞癌由来細胞株
hERG	human ether à go go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HIV-1	human immunodeficiency virus type 1	1 型ヒト免疫不全ウイルス
HRV	human rhinovirus	ヒトライノウイルス
Huh-7	human hepatocellular carcinoma cell line	ヒト肝細胞癌由来細胞株
ICH	International Conference on Harmonization	医薬品規制調和国際会議
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration or concentration of compound causing 50% of maximal inhibition	50%阻害濃度
IFN-α	interferon alpha	インターフェロン α
MRC-5	fibroblast cell line	ヒト肺線維芽細胞由来株
MT-4	human T cell leukemia cell line	成人 T 細胞白血病由来細胞株
NOEL	no observed effect level	無影響量
NS	nonstructural protein	非構造タンパク質
PC-3	human metastatic prostate carcinoma cells	ヒト前立腺癌由来細胞株
RBV	ribavirin	リバビリン
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RSV	respiratory syncytial virus	RS ウイルス

換算係数は以下を使用した:
ベルパタスビル（GS-5816）: 1 μmol/L = 0.883 μg/mL

1 まとめ

本剤はソホスブビル及びベルパタスビル（GS-5816）を有効成分として含有する配合錠であり、本申請資料は慢性 C 型肝炎ウイルス（HCV）感染症の治療に対する本剤の製造販売承認申請の根拠として提出する。

ソホスブビルは、ソバルディ®錠 400mg として平成 27 年 3 月 26 日に国内で承認された。また、平成 29 年 3 月 24 日に効能追加に係る一部変更承認申請（以下、「一変申請」）が承認された。

レジパスビル／ソホスブビル配合剤は、ハーボニー®配合錠（レジパスビル 90 mg 及びソホスブビル 400 mg）として平成 27 年 7 月 3 日に国内で承認された。また、平成 30 年 2 月 16 日に効能追加に係る一変申請が承認された。

ソホスブビルの非臨床薬理試験に関する資料は、ソバルディ®錠及びハーボニー®配合錠の承認及び一変申請時に提出済みであり、CTD2.4 及び CTD2.6.2 に要約した。本申請資料では、ソホスブビル、ベルパタスビル、ソホスブビルとベルパタスビルの併用投与及び本剤を用いた新規の非臨床試験については詳述し、関連する既提出のソホスブビル非臨床試験については必要に応じて再提出する。

ベルパタスビルを用いた包括的非臨床薬理試験プログラムが実施された。安全性薬理試験は、医薬品規制調和国際会議（ICH）が発行するガイドライン及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。予備試験及び探索的試験は、適切な試験計画書及び文書に従って実施することでデータの信頼性を確保した。

本 CTD2.6.2 では一部の副次的薬理試験及び安全性薬理試験の結果について示す。抗ウイルス作用機序、HCV ジェノタイプ選択性及び耐性発現試験を含む *in vitro* 薬理学及び薬力学的試験、HCV 以外のウイルスに対する活性を検討した副次的試験並びに薬力学的薬物相互作用試験については 2.7.2.4.1 項で詳細に示している。

非臨床薬理試験から得られた処方医師に提供すべきと考えられる全ての情報は添付文書案に含まれる。概して、ソホスブビル及びベルパタスビルの非臨床薬理試験結果から、HCV 感染症の治療に対する両薬剤併用による有効性が裏付けられた。

1.1 ベルパタスビル

HCV の非構造タンパク質（NS）5A はウイルスリボ核酸（RNA）複製［1］及び HCV 粒子形成［2、3］に必須である。また、NS5A は多数の宿主タンパク質と相互作用し［4］、宿主の自然免疫応答を回避することで感染を促進すると考えられる［5］。ベルパタスビルは HCV NS5A 活性を抑制して HCV 複製を阻害するよう設計された新規の HCV 阻害剤である。

ベルパタスビルの HCV ジェノタイプ 1～6 及び既知の HCV 耐性変異株に対する *in vitro* 抗ウイルス活性を評価した。また、ベルパタスビルと他の抗 HCV 薬との併用効果についても検討した。これらの試験結果から、複数のレプリコン細胞アッセイにおいてベルパタスビルは選択的に作用し、全ての HCV ジェノタイプに対して有効性を示すこと、また他のウイルスと比較して HCV 選択的に作用することが明らかとなった。

ベルパタスビルは HCV ジェノタイプ 1～6 に対して強い抗ウイルス活性を示し、その平均 50%

効果濃度（EC_{50}）値は 0.002～0.13 nmol/L の範囲であった。交差耐性試験及び *in vitro* 耐性発現試験結果、*in vivo* 耐性プロファイル並びに HCV 関連酵素に対して阻害作用を示さないことから、ベルパタスビルはその作用機序として NS5A を標的とすることが裏付けられた。抗ウイルス作用機序、HCV ジェノタイプ選択性及び耐性発現に関する評価を含む *in vitro* 薬理学及び薬力学的試験の詳細は 2.7.2.4.1 項で考察する。

副次的薬理試験においては、2 種類のヒト肝細胞癌由来細胞株 Huh-7 及び HepG2、ヒト前立腺癌由来細胞株 PC-3、成人 T 細胞白血病由来細胞株 MT-4 並びにヒト肺線維芽細胞由来株 MRC-5 に対して、ベルパタスビルはいずれも懸念すべき明らかな細胞毒性を示さず、HCV ジェノタイプ 1 に対する選択指数は 270,000～3,000,000 倍超であった。また、ベルパタスビル（10 µmol/L）は各種受容体、酵素及びイオンチャネルに対していずれもオフターゲット作用を示さなかった。また安全性薬理試験において、心血管系、呼吸器系及び中枢神経系に対するベルパタスビルの影響は認められなかった。

1.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

ソホスブビルは HCV NS5B ポリメラーゼ阻害薬で、HCV RNA の複製に強い *in vitro* 阻害作用を示す。単剤としてのソホスブビル及びベルパタスビルは、いずれも全ての HCV ジェノタイプに対して強い抗ウイルス活性を示した。ソホスブビルとベルパタスビルの併用により相加的な *in vitro* 抗ウイルス活性を示した。ソホスブビルとベルパタスビルの併用試験において、抗ウイルス作用に対する拮抗作用は認められず、細胞生存率にも有意な変化は認められなかった。*In vitro* 交差耐性試験でソホスブビルとベルパタスビル間に交差耐性は認められなかった。ソホスブビルに対する感受性低下を示す NS5B S282T 変異レプリコンはベルパタスビルに対して十分な感受性を示した。同様に、ソホスブビルはベルパタスビルに対して感受性低下を示した一連の NS5A 変異体に対して十分な活性を示した。以上、両薬剤間に *in vitro* 抗ウイルス活性に対する相加的な相互作用があること及び *in vitro* 交差耐性がないことから、ソホスブビル及びベルパタスビルを配合錠として併用することにより、臨床で相加的な抗 HCV 活性及び有益な耐性プロファイルを示すことが期待される。

単剤としてのソホスブビル及びベルパタスビルは、いずれも生命維持に重要な器官系に対して明らかな影響を示さなかったことから、ソホスブビルとベルパタスビルの併用による追加の安全性薬理試験は必要ないと判断した。

2 効力を裏付ける試験

2.1 ベルパタスビル

ベルパタスビルは HCV NS5A 活性を抑制して HCV の複製を阻害するよう設計された新規の薬物である。複数のレプリコン細胞アッセイにおいてベルパタスビルは選択的に作用し、全ての HCV ジェノタイプに対して強い抗ウイルス作用を示した。またその抗ウイルス作用は HCV に選択的であった。HCV レプリコン細胞アッセイにおいて、HCV ジェノタイプ 1～6 に対して強い抗ウイルス活性を示し、その平均 EC_{50} 値は 0.002～0.13 nmol/L の範囲であった。ベルパタスビルは、NS5A 領域の M31 変異を有するジェノタイプ 2 に対して特に強い作用を示した（EC_{50} 値：0.006～0.016 nmol/L）（2.7.2.4.1.1.1.2 項；PC-281-2024）。ベルパタスビルはレプリコン細胞アッセイに高い選択性を示した（HCV ジェノタイプ 1 に対する選択指数は 270,000～3,000,000 倍超］（2.7.2.4.1.1.1.2 項；PC-281-2007）。交差耐性試験及び *in vitro* 耐性発現試験結果、*in vivo* 耐性プロファイル並びに HCV 関連酵素に対して阻害作用を示さないことから、ベルパタスビルはその作用機序として NS5A を標的とすることが裏付けられた。ベルパタスビルによる抗ウイルス作用機序、HCV ジェノタイプ選択性及び耐性発現に関する評価を含む *in vitro* 薬理学及び薬力学的試験の詳細は 2.7.2.4.1 項に示す。

2.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

単一製剤としてのベルパタスビルは、HCV ジェノタイプ 1～6 のレプリコン細胞に対して強い阻害作用を示した（2.7.2.4.1.1.1.2 項；PC-281-2024）。ソホスブビルとベルパタスビルの併用により相加的な *in vitro* 抗ウイルス活性を示した。ソホスブビルとベルパタスビルの併用試験において、抗ウイルス作用に対する拮抗作用は認められず、細胞生存率にも有意な変化は認められなかった。（2.6.3.1.2 項；PC-334-2004 及び PC-334-2014）。*In vitro* 交差耐性試験において、ソホスブビルとベルパタスビルの間に交差耐性は認められなかった。ソホスブビルに対する感受性低下を示す NS5B S282T 変異レプリコンは、ベルパタスビルに対して十分な感受性を示した（2.7.2.4.1.1.1.9 項；PC-281-2011 及び PC-338-2017）。同様に、ベルパタスビルに対して感受性低下を示した一連の NS5A 変異体に対してソホスブビルは十分な活性を示した（2.7.2.4.1.1.1.9 項；PC-338-2017）。ソホスブビルとベルパタスビルの併用による *in vitro* 薬理学及び薬力学的試験の詳細は 2.7.2.4.1 項に示す。

3 副次的薬理試験

3.1 ベルパタスビル

3.1.1 HCV 以外のウイルスに対する活性

HCV 以外のウイルスに対するベルパタスビルの薬理学的活性については 2.7.2.4.1 項に詳細を示す。要約すると、牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）、RS ウイルス（RSV）、B 型肝炎ウイルス（HBV）、1 型ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）、ヒトライノウイルス（HRV）、インフルエンザウイルス A 及び B 並びに一連のフラビウイルス（ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、デングウイルス及びバンジウイルスを含む）に対するベルパタスビルの抗ウイルス活性を検討した結果、HCV に対する強い抗ウイルス活性とは対照的に、ベルパタスビルは BVDV（フラビウイルスの近縁）、RSV、HBV 及び HIV を含むいずれのウイルスに対しても、検討した最高濃度又は細胞毒性を生じない最高濃度において選択的な抗ウイルス活性を示さなかった（2.7.2.4.1.2.1.1 項；PC-256-2036 及び PC-281-2009）。以上の結果から、HIV や HBV に重複感染している HCV 患者においてベルパタスビル使用の可能性が支持された。

3.1.2 *In Vitro* 細胞毒性

HCV レプリコン細胞に加えて、ベルパタスビルの *in vitro* 細胞毒性を 2 種類のヒト肝細胞癌由来細胞株 Huh-7 及び HepG2、ヒト前立腺癌由来細胞株 PC-3、成人 T 細胞白血病由来細胞株 MT-4 並びにヒト肺線維芽細胞由来株 MRC-5 を用いて検討した（2.6.3.1.3 項；PC-281-2014）。ベルパタスビルを 5 日間処理したときの 50%細胞毒性濃度（CC_{50} 値）は、5 種中 4 種の細胞株で 44,444 nmol/L を上回り、PC-3 細胞では 4,028 nmol/L であった（表 1）。HCV ジェノタイプ 1（1a 及び 1b に対する平均 EC_{50} 値はそれぞれ 0.012 及び 0.015 nmol/L）（2.7.2.4.1.1.1.2 項；PC-281-2007）に対する選択指数は 270,000～3,000,000 超であり、これらの細胞に対するベルパタスビルの細胞毒性は低いことが示された。

表 1 各種細胞株におけるベルパタスビル 5 日間処理後の細胞毒性

	Cytotoxicity CC_{50} (nmol/L)[a]				
Compound	**Huh-7**	**HepG2**	**PC-3**	**MT-4**	**MRC-5**
VEL	> 44,444	> 44,444	4,028	> 44,444	> 44,444

VEL = velpatasvir
a Values represent the arithmetic mean of at least 2 independent experiments in a 384-well format.
Source: Study No. PC-281-2014

3.1.3 *In Vitro* 受容体結合試験

各種受容体、酵素及びイオンチャネル標準パネルを用いて、ベルパタスビルの潜在的オフターゲット活性を評価した結果、ベルパタスビル（10 μmol/L）はいずれの標的に対しても明らかな作用を示さなかった（2.6.3.1.3 項；PC-281-2001）。

3.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

単剤としてのソホスブビル及びベルパタスビルはいずれも明らかな細胞毒性を示さなかった。ソホスブビルとベルパタスビルの併用による *in vitro* 細胞毒性試験をジェノタイプ 1a、1b、2a、3a 及び 4a のレプリコン細胞を用いて検討した。ソホスブビルの最高濃度を 320 nmol/L とし、ベルパタスビルの最高濃度を 0.08 nmol/L（ジェノタイプ 1a）又は 0.064 nmol/L（ジェノタイプ 1b、2a、3a 及び 4a）として併用し、細胞生存率から細胞毒性を評価した。検討したいずれのレプリコン細胞においてもソホスブビルとベルパタスビルの併用による細胞生存率の有意な変化は認められなかった（2.6.3.1.2 項；PC-334-2004 及び PC-334-2014）。

また、ソホスブビルはヒト RNA 及びデオキシリボ核酸（DNA）ポリメラーゼ阻害に関連した有害作用をもたらす可能性が低く、ソホスブビルによるミトコンドリア毒性の発現を示唆する所見もない。ソホスブビル及びベルパタスビルはオフターゲット活性を示す可能性が低いことから、ソホスブビルとベルパタスビルの併用による追加の副次的薬理試験は必要ないと判断した。

4 安全性薬理試験

ベルパタスビルの臨床開発をサポートするため、非臨床安全性薬理試験において生命維持に重要な器官系に対するベルパタスビルの影響を検討した。全ての安全性薬理試験は、GLP に準拠し、ICH S7A（安全性薬理試験ガイドライン）に従って実施した。

適切な薬物動態プロファイル及びヒトと同様の *in vitro* 代謝プロファイルを示すことから、*in vivo* 試験で使用する動物種にはラット及びイヌを選択した。ラット及びイヌの反復投与毒性試験で性差が認められなかったため、ベルパタスビルの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に関する安全性薬理試験では雄のみを用いた。ヒトで予定される投与経路と同じ経口投与で試験を行った。経口投与溶液は、45%プロピレングリコール（v/v）／15% Solutol® HS-15（v/v）／40%逆浸透水（塩酸で pH2.0 ± 0.1 に調整）に溶解した。ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウムチャネル電流に対する作用を検討した *in vitro* 試験では、ジメチルスルホキシド（DMSO）を溶媒とした。

4.1 ベルパタスビル

4.1.1 中枢神経系に対する作用

ラットの中枢神経系に対するベルパタスビルの影響を、Irwin 変法を用いて評価した（2.6.3.4.2 項 ; PC-281-2004）。4 群の雄性 Sprague-Dawley ラット（8 匹／群）に溶媒又はベルパタスビル 20、60 及び 200 mg/kg を投与容量 5 mL/kg で単回経口投与した。ケージ越しの観察、ハンドリング時の反応、オープンフィールド及び刺激に対する反応を含む Irwin 変法を用いた行動評価を、投与前並びに投与後 1、3、5、8 及び 24 時間後に実施した。死亡、一般症状及び体温を含む一般的な毒性データも記録した。予定された安楽死まで全てのラットが生存した。ベルパタスビル投与に関連した一般症状及び体温への影響は認められなかった。ケージ越しの観察、ハンドリング時の反応、オープンフィールド及び刺激に対する反応を含む Irwin 変法を用いた行動評価において、ベルパタスビルによる中枢神経系への影響はいずれの測定時点においても認められなかった。以上の結果から、ラットの中枢神経系に対する無影響量（NOEL）は 200 mg/kg であった。

4.1.2 心血管系に対する作用

4.1.2.1 *In Vitro*

ベルパタスビルの急速活性型遅延整流カリウム電流 IKr の指標として hERG カリウム電流に対する阻害作用を、hERG 発現細胞を用いた *in vitro* 試験で評価した（2.6.3.4.1 項 ; PC-281-2006）。

ベルパタスビルは 3 µmol/L で 0.7 ± 0.3%（平均値±標準誤差、n=3）、6.5 µmol/L で 0.9 ± 1.0%（n=3）と hERG カリウム電流をわずかに阻害したが、これは溶媒による作用（0.7 ± 0.7%、n=4）と同程度であった。溶解性のため hERG カリウム電流に対するベルパタスビルの 50%阻害濃度（IC_{50}）値を算出することはできなかったが、6.5 µmol/L を超えると推定された。陽性対照（60 nmol/L テルフェナジン）は hERG カリウム電流を 80.7 ± 1.8%（平均値±標準偏差、n=2）阻害し、同試験系の

感度が確認されている。

4.1.2.2 *In Vivo*

覚醒ビーグル犬を用いてベルパタスビルの心血管系に対する影響をテレメトリー法により評価した（2.6.3.4.2 項 ; PC-281-2003）。4 匹の雄性ビーグル犬に、ラテン方格法を用いて溶媒又はベルパタスビル 5、20 及び 100 mg/kg を投与容量 2 mL/kg で第 1 日、8 日、15 日及び 22 日に単回経口投与した。全身の健康状態は一般症状及び体重により評価した。ベルパタスビル投与に関連する死亡、瀕死及び体重又は摂餌量に対する影響は認められなかった。心血管機能は血行動態及び心電図（ECG）パラメーターにより評価した。投与の少なくとも 90 分前から投与後少なくとも 25 時間まで連続してテレメトリーデータを記録した。

ベルパタスビル 5、20 及び 100 mg/kg 投与 4.5 時間後の平均血漿中濃度は、それぞれ 149、730 及び 1267 ng/mL であり、投与した全てのイヌで被験物質による曝露が確認された。定性的又は定量的 ECG パラメーター及び血行動態データに対するベルパタスビルによる影響は認められなかった。以上の結果から、イヌの心血管系に対する NOEL は 100 mg/kg であった。

4.1.3 呼吸器系に対する作用

ラットの呼吸器系に対するベルパタスビルの影響を、1 回換気量、呼吸数及び分時換気量により評価した（2.6.3.4.2 項 ; PC-281-2005）。4 群の雄性 Sprague-Dawley ラット（8 匹／群）に溶媒又はベルパタスビル 20、60 又は 200 mg/kg を投与容量 5 mL/kg で単回経口投与した。投与 2 日前に少なくとも 2.5 時間（ベースライン）、投与約 1.5 時間後から少なくとも 8 時間後まで、及び投与約 22.5 時間後から少なくとも 2.5 時間、プレチスモグラフィーデータを連続して記録した。プレチスモグラフィーのデータは、ベースライン、投与 2 時間後から 8 時間後まで、及び投与 24 時間後の 30 分間平均値を解析した。全身の健康状態は一般症状及び死亡により評価した。

投与 2 日目のプレチスモグラフィーデータ最終測定後に予定された安楽死まで全てのラットが生存した。いずれの用量でも死亡、瀕死及び毒性徴候はみられなかった。ベルパタスビル 20、60 又は 200 mg/kg 投与による呼吸数、1 回換気量及び分時換気量の変化は認められなかった。以上の結果から、ラットの呼吸器系に対する NOEL は 200 mg/kg であった。

4.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

単剤としてソホスブビル及びベルパタスビルは、安全性薬理試験においていずれも生命維持に重要な器官系に対して生物学的に意義のある影響を示さなかった。ソホスブビル及びベルパタスビルでは重複する所見は認められなかったことから、併用によって中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する明らかな影響が認められることは考えにくい。以上の理由から、ソホスブビルとベルパタスビル併用による安全性薬理試験は実施しなかった。

5　　薬力学的薬物相互作用試験

ベルパタスビルを用いた薬力学的薬物相互作用試験の詳細は 2.7.2.4.1.3 項に示す。ベルパタスビルは、インターフェロン α（IFN-α）、リバビリン（RBV）、ソホスブビル、テラプレビル、ボセプレビル、シメプレビル、ダクラタスビル及びレジパスビルと併用したとき、相加的な抗ウイルス作用を示した。ベルパタスビルと併用した薬剤との間にはいずれも明らかな拮抗作用は認められず、併用による明らかな細胞生存率の変化も認められなかった（2.7.2.4.1.3.2 項；PC-256-2035 及び PC-281-2012）。

HIV 及び HCV の重複感染患者は、HCV 感染に対してベルパタスビルを含むレジメンで治療を受ける可能性があるため、ベルパタスビルの抗ウイルス活性に対する抗 HIV 薬の作用を、レプリコン細胞を用いて評価した（2.7.2.4.1.3.1.2 項；PC-256-2034）。ベルパタスビルの EC_{50} 値はいずれの抗 HIV 薬の存在下でも同程度であり、検討した抗 HIV 薬はベルパタスビルの抗ウイルス作用に明らかな影響を及ぼさないことが示された。また、臨床で使用される各種抗 HIV 薬の *in vitro* 活性に対してベルパタスビルが拮抗作用を示す可能性も検討した（2.7.2.4.1.3.1.2 項；PC-256-2034）。ベルパタスビルは、検討した抗 HIV 薬の抗ウイルス作用に対する拮抗作用及び併用による細胞毒性増強作用のいずれをも示さなかった。

6 考察及び結論

6.1 ベルパタスビル

ベルパタスビルは HCV ジェノタイプ 1～6 のレプリコン細胞に対して強い活性を示し、その平均 EC_{50} 値は 0.002～0.13 nmol/L の範囲であった。複数の細胞株に対する細胞毒性は低く、HCV ジェノタイプ 1 にする選択指数は 270,000～3,000,000 倍超であった。*In vitro* スクリーニング試験において、ベルパタスビルはいずれのイオンチャネル及び受容体に対しても明らかな阻害作用を示さなかった。ベルパタスビルを用いた安全性薬理試験で、ラットの中枢神経系及び呼吸器系に対して最高用量の 200 mg/kg まで、イヌの心血管系に対して最高用量の 100 mg/kg までいずれも影響は認められなかった。hERG カリウム電流に対するベルパタスビルの阻害作用の IC_{50} 値は 6.5 µmol/L を上回ると推定された。以上、ベルパタスビルによる細胞毒性、イオンチャネル及び受容体阻害作用及び生命維持に重要な器官系に対する影響に関して、臨床上問題となる懸念は認められなかった。

6.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

単剤としてのソホスブビル及びベルパタスビルは、いずれも HCV ジェノタイプ 1～6 のレプリコン細胞に対して強い抗ウイルス活性を示した。ソホスブビルとベルパタスビルの併用により、相加的な抗ウイルス活性が認められた。併用試験において、抗ウイルス作用に対する拮抗作用は認められず、細胞毒性にも明らかな変化は認められなかった。*In vitro* 交差耐性試験において、ソホスブビルとベルパタスビル間に交差耐性は認められなかった。以上、両薬剤間に *in vitro* 抗ウイルス活性に対する相加的な相互作用があること及び *in vitro* 交差耐性がないことから、ソホスブビル及びベルパタスビルを配合錠として併用することにより、HCV に対する相加的な抗ウイルス活性及び薬剤耐性プロファイルの改善が得られると考えられる。さらに、ソホスブビル及びベルパタスビルを単剤で各種抗 HIV 薬と併用したとき、ソホスブビル及びベルパタスビルの抗 HCV 活性及び抗 HIV 薬の抗 HIV 活性に対する拮抗作用並びに細胞毒性作用は認められなかった。

単剤としてのソホスブビル及びベルパタスビルは、いずれも各種イオンチャネル及び受容体阻害に対する明らかなオフターゲット作用を示さず、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に関する安全性薬理試験においていずれも臨床的に問題となる作用は認められなかった。単剤で影響が認められなかったことから、ソホスブビル／ベルパタスビル併用による追加の安全性薬理試験の実施は必要ないと判断した。

7　　表

表は本文中の適切な場所に記載した。

8 参考文献

1 Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. J Virol 2001;75 (3):1252-64.

2 Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. PLoS Pathog 2008;4 (3):e1000032.

3 Hughes M, Griffin S, Harris M. Domain III of NS5A contributes to both RNA replication and assembly of hepatitis C virus particles. J Gen Virol 2009;90 (Pt 6):1329-34.

4 Macdonald A, Harris M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. J Gen Virol 2004;85 (Pt 9):2485-502.

5 Freundt EC, Lenardo MJ. Interfering with interferons: Hepatitis C virus counters innate immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102 (49):17539-40.

ソホスブビル／ベルパタスビル

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁
1 薬理試験：一覧表 3
1.1 効力を裏付ける試験 3
1.2 副次的薬理試験（ソホスブビルとベルパタスビルの併用） 4
1.3 副次的薬理試験（ベルパタスビル） 5
1.4 安全性薬理試験：*In Vitro*（ベルパタスビル） 6
1.5 安全性薬理試験：*In Vivo*（ベルパタスビル） 7
1.6 薬力学的薬物相互作用試験 8
2 効力を裏付ける試験 9
3 副次的薬理試験 10
4 安全性薬理試験 11
4.1 *In Vitro*（ベルパタスビル） 11
4.2 *In Vivo*（ベルパタスビル） 12
5 薬力学的薬物相互作用試験 13

1　　薬理試験：一覧表

1.1　　効力を裏付ける試験

ベルパタスビル、及びソホスブビルとベルパタスビル併用による効力を裏付ける試験は 2.7.2.4.1 項を参照のこと。

1.2 副次的薬理試験（ソホスブビルとベルパタスビルの併用）

Test Articles: SOF and VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study Number
In Vitro Combination of SOF and other HCV Inhibitors	No	Huh7-lunet cells (GT1a replicon)	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA	PC-334-2004
In Vitro Combination of SOF and other HCV Inhibitors	No	Huh7-lunet cells (GT1b, 2a,3a,4a replicons)	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA	PC-334-2014

SOF = sofosbuvir; VEL = velpatasvir; GT = genotype; GLP = Good Laboratory Practice; HCV = hepatitis C virus; Huh7 = human hepatocellular carcinoma cell line;
a An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

1.3 副次的薬理試験（ベルパタスビル）

Test Article: VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study Number
Antiviral Activity Against Other Viruses	No	BVDV replicon/ Huh7-lunet cells, HIV/MT-4 cells, HBV/AD-38 cells, and RSV/Hep-2 cells	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA	PC-281-2009
Cytotoxicity Assay with VEL, Antiviral Specificity of VEL	No	HeLa, NHBE, Vero, and Vero 76 Cells	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA and [redacted]	PC-256-2036
Cellular Cytotoxicity Evaluation of VEL in Multiple Cell Lines	No	Huh-7, HepG2, PC-3, MT-4, MRC-5	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA	PC-281-2014
In Vitro Receptor Binding of VEL	No	Various receptors, enzymes and ion channels	*In Vitro*	[redacted] France	PC-281-2001

VEL = velpatasvir; BVDV = bovine viral diarrhea virus; GLP = Good Laboratory Practice; HBV = hepatitis B virus; HeLa = human epithelial adenocarcinoma cell line; HepG2 = human hepatocellular carcinoma cell line; HIV = human immunodeficiency virus; Huh-7 = human hepatocellular carcinoma cell line; MRC-5 = fibroblast cell line; MT-4 = human T cell leukemia cell line; NHBE = human bronchial epithelial cells; PC-3 = human metastatic prostate carcinoma cells; RSV = respiratory syncytial virus; Vero = African green monkey kidney cells

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

1.4 安全性薬理試験：*In Vitro*（ベルパタスビル）

Test Article: VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study Number
Cardiovascular (Effects on hERG Current) with VEL	Yes	HEK293 Cells	*In Vitro*	[redacted]	PC-281-2006

VEL = velpatasvir; GLP = Good Laboratory Practice; HEK293 = human embryonic kidney cells; hERG = human ether-a-go-go related gene
a An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

1.5 安全性薬理試験：*In Vivo*（ベルパタスビル）

Test Article: VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Species/Strain	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study Number
Effects on Central Nervous System	Yes	Rat/Sprague Dawley	Oral Gavage	[redacted]	PC-281-2004
Effects on Cardiovascular System	Yes	Dog/Beagle	Oral Gavage	[redacted]	PC-281-2003
Effects on Respiratory System	Yes	Rat/Sprague Dawley	Oral Gavage	[redacted]	PC-281-2005

VEL = velpatasvir; GLP = Good Laboratory Practice
a An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

1.6 薬力学的薬物相互作用試験

ベルパタスビル、及びソホスブビルとベルパタスビル併用による薬力学的薬物相互作用試験は2.7.2.4.1 項を参照のこと。

2　　効力を裏付ける試験

ベルパタスビル、及びソホスブビルとベルパタスビル併用による効力を裏付ける試験の詳細は2.7.2.4.1 項を参照のこと。

3　副次的薬理試験

ベルパタスビル、及びソホスブビルとベルパタスビル併用による副次的薬理試験の詳細は2.6.2.3 項を参照のこと。

4 安全性薬理試験

4.1 *In Vitro*（ベルパタスビル）

Test Article: VEL

Organ Systems Evaluated	**Test System**	**Method of Administration**	**Dose (µmol/L)**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP[a]**	**Gilead Study Number**
Cardiovascular (hERG Inhibition)	HEK293 Cells	*In Vitro*	3, 6.5	3 cells per concentration	IC_{50} > 6.5 µmol/L	Yes	PC-281-2006

VEL = velpatasvir; GLP = Good Laboratory Practice; HEK293 = human embryonic kidney cells; hERG = human ether-a-go-go related gene
a An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

4.2 *In Vivo*（ベルパタスビル）

Test Article: VEL

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	No. per Group	Noteworthy Findings	GLP[a]	Gilead Study Number
Central Nervous System	Rat/Sprague Dawley	Oral Gavage	0, 20, 60, 200	8 males/ group	None. NOEL 200 mg/kg.	Yes	PC-281-2004
Cardiovascular	Dog/Beagle	Oral Gavage	0, 5, 20, 100	4 males; Latin square design	None. NOEL 100 mg/kg.	Yes	PC-281-2003
Respiratory	Rat/Sprague Dawley	Oral Gavage	0, 20, 60, 200	8 males/ group	None. NOEL 200 mg/kg.	Yes	PC-281-2005

VEL = velpatasvir; GLP = Good Laboratory Practice; NOEL = no observed effect level
a An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

5　　薬力学的薬物相互作用試験

ベルパタスビル、及びソホスブビルとベルパタスビル併用による薬力学的薬物相互作用試験の詳細は 2.7.2.4.1 項を参照のこと。