TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 3
LIST OF FIGURES 3
本項で使用する用語・略語 4
1. 非臨床試験計画概略 7
2. 薬理試験 9
2.1. 要約 9
2.2. 効力を裏付ける試験 12
2.2.1. In vitro 試験 12
2.2.1.1. 作用機序 12
2.2.1.2. ニルマトレルビルの選択性 14
2.2.1.3. ニルマトレルビルの抗ウイルス活性 14
2.2.1.4. SARS-CoV-2 の主要変異株に対する作用 16
2.2.1.5. 変異 SARS-CoV-2 M^{pro} 酵素に対するニルマトレルビルの作用 17
2.2.1.6. 組換え SARS-CoV-2 に対するニルマトレルビルの作用，ウイルス適合性および耐性の in vitro 評価 17
2.2.1.7. MHV ウイルスを用いた in vitro 耐性ウイルス選択試験 18
2.2.1.8. SARS-CoV-2 ウイルスを用いた in vitro 耐性ウイルス選択試験 18
2.2.2. In vivo 試験 19
2.2.2.1. Balb/c マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおける in vivo 作用 20
2.2.2.2. Balb/c マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおけるニルマトレルビル，リトナビルおよび両者の併用による in vivo 作用 20
2.2.2.3. 129 マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおける in vivo 作用 21
2.3. 副次的薬理試験 21
2.4. 安全性薬理試験 22
2.5. 薬力学的薬物相互作用 24
3. 薬物動態試験 25
3.1. 要約 25
3.2. 分析法 26
3.3. 吸収 27
3.3.1. In vitro での吸収 27
3.3.2. 単回投与時の薬物動態 27

3.3.3. 反復投与時の薬物動態（トキシコキネティクス） 27
3.4. 分布 28
3.4.1. In vitro での血漿タンパク結合率 28
3.4.2. In vitro での血液／血漿中濃度比（Cb/Cp） 28
3.4.3. ラットにおける組織分布 28
3.5. 代謝 28
3.6. 排泄 30
3.7. 薬物動態学的薬物相互作用 31
3.7.1. P450 に対する阻害能 31
3.7.2. P450 および UGT を介した相互作用 32
3.7.3. トランスポーターを介した相互作用 33
3.7.3.1. トランスポーターの基質となる可能性 33
3.7.3.2. トランスポーターに対する阻害能 34
4. 毒性試験 35
4.1. 要約 35
4.2. 単回投与毒性試験 38
4.3. 反復投与毒性試験 38
4.3.1. ラットを用いた試験 38
4.3.1.1. ラットを用いた探索的 4 日間経口投与毒性試験 38
4.3.1.2. ラットを用いた 2 週間経口投与毒性試験 38
4.3.1.3. ラットを用いた 1 ヵ月間経口投与毒性試験 39
4.3.2. サルを用いた試験 41
4.3.2.1. サルを用いた探索的 4 日間（1 日 2 回）経口投与毒性試験 41
4.3.2.2. サルを用いた 15 日間（1 日 2 回）経口投与毒性試験 41
4.3.2.3. サルを用いた 1 ヵ月間（1 日 2 回）経口投与毒性試験 42
4.4. 遺伝毒性試験 43
4.5. がん原性試験 43
4.6. 生殖発生毒性試験 43
4.6.1. ラットを用いた受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験 43
4.6.2. ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 43
4.6.3. ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 44
4.6.4. ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 44

4.7. 局所刺激性試験 45
4.8. その他の毒性試験 45
4.8.1. 光毒性試験 45
4.8.2. 抗原性試験 45
4.8.3. 免疫毒性試験 45
4.8.4. 毒性発現の機序に関する試験 45
4.8.5. 依存性試験 45
4.8.6. 代謝物の毒性試験 45
4.8.7. 不純物の毒性試験 45
4.8.8. その他の試験 46
4.9. 所見と薬物動態の関係 46
4.10. 標的臓器毒性 48
5. 総括及び結論 50
6. 参考文献 54

LIST OF TABLES

Table 1. SARS-CoV-2 Mpro の主なニルマトレルビル接触残基における変異 14
Table 2. ニルマトレルビルの安全性薬理試験の概要 23
Table 3. ニルマトレルビルの LC-MS/MS 法バリデーション 26
Table 4. ラットおよびサルにおけるニルマトレルビルの薬物動態パラメータ 27
Table 5. ニルマトレルビルの血漿タンパク結合率 28
Table 6. P450 および UGT に関する薬物相互作用試験の要約 33
Table 7. トランスポーター基質性試験の要約 33
Table 8. 各種トランスポーターに対するニルマトレルビルの in vitro での特性 34
Table 9. 毒性試験の概要 36
Table 10. 主な所見とニルマトレルビル投与量 47

LIST OF FIGURES

Figure 1. SARS-CoV-2 M^{pro} に結合するニルマトレルビルの共結晶構造 13
Figure 2. ヒトにニルマトレルビル 300 mg をリトナビルと併用経口投与した際のニルマトレルビルの血中代謝プロファイル 30

本項で使用する用語・略語

略号，用語	省略していない表現または定義
3CL	3C-like：3C 様
A-B	apical-to-basolateral：頂端膜側から基底膜側
ACE2	angiotensin converting enzyme 2：アンジオテンシン変換酵素 2
ADME	absorption, distribution, metabolism and excretion：吸収，分布，代謝および排泄
A/G	albumin/globulin：アルブミン/グロブリン
ALT	alanine aminotransferase：アラニンアミノトランスフェラーゼ
ALP	alkaline phosphatase：アルカリホスファターゼ
APTT	activated partial thromboplastin time：活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
AUC	area under the plasma concentration-time curve：血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{24}	area under the plasma concentration-time curve from zero to 24 hours：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{inf}	area under the plasma concentration-time curve from zero to infinity：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{last}	area under the plasma concentration-time curve from zero to time of last measurement：投与後 0 時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein
BID	twice daily：1 日 2 回（投与）
BSA	bovine serum albumin：ウシ血清アルブミン
Caco-2	human colonic adenocarcinoma cells：ヒト結腸癌由来細胞
C_{av}	average plasma concentration：平均血漿中濃度
Cb/Cp	concentration in blood/concentration in plasma：血液/血漿中濃度比
CC_{50}	concentration required for 50% cytotoxicity：50%細胞毒性濃度
$CCID_{50}$	cell culture infectious dose required for 50% cell death：50%細胞培養感染量
CI	confidence interval：信頼区間
CL	total clearance：全身クリアランス
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
C_{min}	minimum plasma concentration：最低血漿中濃度
CoV	coronavirus：コロナウイルス
COVID-19	coronavirus disease 2019：新型コロナウイルス感染症
CPE	cytopathic effect：細胞変性効果
CYP	cytochrome P450
dNHBE	differentiated normal human bronchial epithelial cells：分化正常ヒト気管支上皮細胞
+dP/dT	cardiac contractility：心収縮性
EC_{50}	concentration corresponding to 50% of the maximum effect：最大効果の 50%の効果を示す濃度
EC_{90}	concentration corresponding to 90% of the maximum effect：最大効果の 90%の効果を示す濃度
ECD	European Community Directives
EMA	European Medicines Agency：欧州医薬品庁
EV	enterovirus：エンテロウイルス
F	bioavailability：バイオアベイラビリティ
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
FIH	first-in-human

略号，用語	省略していない表現または定義
f_m	fraction metabolized：当該酵素で代謝される割合
FOB	functional observational battery：機能観察総合評価法
FRET	fluorescence resonance energy transfer：蛍光共鳴エネルギー移動
fu	fraction unbound：非結合型分率
GISAID	Global Initiative on Sharing All Influenza Data：インフルエンザウイルス遺伝子データベース
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
HCoV	human coronavirus：ヒトコロナウイルス
HEK	human embryonic kidney：ヒト胎児由来腎臓
hERG	human ether-a-go-go-related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HIV	human immunodeficiency virus：ヒト免疫不全ウイルス
HPMCAS-MG	hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate high granular
HRV	human rhinovirus：ヒトライノウイルス
IC_{50}	50% inhibitory concentration：50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
IV	intravenous：静脈内
k_a	absorption rate constant：吸収速度定数
K_I	apparent inactivation constant at half-maximal rate of inactivation：最大不活性化速度の50%の速度をもたらす阻害剤の濃度
K_i	inhibition constant：阻害定数
k_{inact}	maximal inactivation rate：最大不活性化速度定数
$k_{p,uu}$	unbound partition coefficient：組織/血漿間非結合型薬物濃度比
LC-MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry：液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析
LV +dP/dt max	maximum positive slop of the left ventricular pressure wave：左心室内圧最大上昇速度
MA-SARS-CoV-2	mouse-adapted severe acute respiratory syndrome coronavirus 2：マウス馴化重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2
MATE	multidrug and toxin extrusion
MDCK	Madin-Darby canine kidney：Madin-Darby イヌ腎臓
MERS	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus：中東呼吸器症候群関連コロナウイルス
M^{pro}	Main protease：メインプロテアーゼ
MRC-5	Medical Research Council cell strain 5
mRNA	messenger ribonucleic acid：メッセンジャーRNA
MTBE	methyl tert-butyl ether
MTD	maximum tolerated dose：最大耐量
m/z	mass to charge ratio：質量電荷比
NA	not applicable：適用なし
ND	not determined：算出せず
NLRV	Nano luciferase reporter virus：ナノルシフェラーゼレポーターウイルス
NMR	nuclear magnetic resonance：核磁気共鳴
NOAEL	no-observed-adverse-effect level：無毒性量
NOEL	no-observed-effect level：無作用量
NR	not reported：報告なし
NTCP	Na taurocholate cotransporting polypeptide

略号，用語	省略していない表現または定義
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構
P450	cytochrome P450：シトクロム P450
P_{app}	apparent permeability coefficient：見かけの透過係数
PD	pharmacodynamics：薬力学
PDE	phosphodiesterase：ホスホジエステラーゼ
PEPT	peptide transporter：ペプチドトランスポーター
PFU	plaque-forming unit：プラーク形成単位
P-gp	p-glycoprotein：P-糖タンパク質
PK	pharmacokinetics：薬物動態
PO	oral：経口
PR	time from the beginning of the P wave to the beginning of the QRS complex in the electrocardiogram：心電図上の P 波の開始から QRS 群の開始までの時間
PT	prothrombin time：プロトロンビン時間
QRS	time from the beginning of the Q wave to the end of the S wave in the electrocardiogram：心電図上の Q 波の開始から S 波の終了までの時間
QT	time from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave in the electrocardiogram：心電図上の QRS 群の開始から T 波の終了までの時間
QTc	QT interval corrected for heart rate：心拍数で補正した QT 間隔
RD	Rhabdomyosarcoma：横紋筋肉腫
RdRp	RNA dependant RNA polymerase：RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ
RR	time from the peak of one QRS complex to the peak of the next：2 つの QRS 波の頂点の間の時間
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction：逆転写定量 DNA ポリメラーゼ連鎖反応
SARS-CoV-1	severe acute respiratory syndrome coronavirus 1：重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 1
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2：重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2
$t_{½}$	terminal phase elimination half-life：終末相の消失半減期
TI	therapeutic index：治療指数
TK	toxicokinetics：トキシコキネティクス
T_{max}	time to first occurrence of Cmax：最高濃度到達時間
TMPRSS	transmembrane serine protease：Ⅱ型膜貫通型セリンプロテアーゼ
UGT	uridine diphosphate-glucuronosyltransferase：UDP グルクロン酸転移酵素
Vero	monkey kidney cells：サル腎臓細胞
V_{ss}	volume of distribution at steady state：定常状態時の分布容積

1. 非臨床試験計画概略

ニルマトレルビル（PF-07321332）は，COVID-19 患者の治療薬として経口投与可能な SARS-CoV-2 メインプロテアーゼ［M^{pro}；3C 様（3CL）プロテアーゼとも呼ばれる］の強力かつ選択的な阻害薬で，低用量のリトナビルと併用投与される。リトナビルは臨床においてニルマトレルビルの CYP3A4 を介した代謝を阻害することにより，ニルマトレルビルの曝露量を増加・維持させる。

ニルマトレルビルの薬理学的特性として，一連の in vitro 酵素および細胞を用いたアッセイでニルマトレルビルの SARS-CoV-2 に対する活性および選択性を評価した。M^{pro} に結合したニルマトレルビルの X 線共結晶構造から，ニルマトレルビルが標的と特異的に相互作用することが確認された。SARS-CoV-2 の M^{pro} はシステインプロテアーゼであることから，ニルマトレルビルの哺乳類システイン（カスパーゼ 2，カテプシン B，カテプシン L），セリン（キモトリプシン，エラスターゼ，トロンビン），アスパルチル（カテプシン D）ならびにレトロウイルスアスパルチル（HIV-1）プロテアーゼに対する活性を評価した。また，SARS-CoV-2 はβコロナウイルスであることから，β コロナウイルス属の他のウイルスである MERS，HCoV-OC43 および HCoV-HKU1 の M^{pro} に対するニルマトレルビルの活性を評価し，α コロナウイルス属の HCoV-229E および HCoV-NL63 についても評価した。

ニルマトレルビルの SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス活性および細胞毒性は，種々の感染細胞に対する細胞変性効果（CPE）法およびナノルシフェラーゼレポーターウイルス（NLRV）法を用いて評価し，変異型ウイルスに対する活性の評価には qPCR アッセイも使用した。抗ウイルスアッセイには，生理的に適切と考えられる dNHBE 気道上皮細胞，ACE2 を発現するヒト腺癌由来 A549-ACE2 肺胞基底上皮細胞，ならびに 5 種類のアフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞（Vero76，Vero E6，ACE2 を発現する Vero E6，P-gp をノックアウトした Vero E6 および TMPRSS2 を発現する Vero E6）を用いた。ニルマトレルビルの抗ウイルス活性は他のコロナウイルス，すなわち SARS-CoV-1，MERS-CoV，HCoV-229E および MHV についても評価し，それぞれ VeroE6，Vero81，MRC-5 および L929 細胞を用いて実施した。また，他の呼吸器系ウイルスであるエンテロウイルス（EV）71 およびヒトライノウイルス（HRV）1B についても，それぞれヒト横紋筋肉腫（RD）細胞および H1 HeLa 細胞を用いて評価した。

SARS-CoV-2 の野生型（USA-WA1/2020 株）ならびに懸念される変異株または注目すべき変異株であるアルファ，ベータ，ガンマ，ラムダ，デルタ，ミューおよびオミクロン株に対するニルマトレルビルの抗ウイルス活性を評価した。

SARS-CoV-2 M^{pro} の自然発生多型がニルマトレルビルの活性に及ぼす影響について，組換え M^{pro} 酵素を用いた生化学的アッセイによって検討した。ニルマトレルビルとの主要な接触部位の点変異および流行ウイルスで最も高頻度に認められる変異について検討した。自然には多型が認められていない M^{pro} 酵素のアミノ酸部位についても検討した。なお，M^{pro} におけるこれらの置換の臨床的意義は不明である。

ニルマトレルビルに対する耐性獲得の可能性を評価するため，種々の検討を行った。最初の検討では SARS-CoV-2 のマウスサロゲートウイルスである MHV を用いた。ニルマトレルビル濃度を漸増させて細胞を継代することにより，ニルマトレルビル感受性の低下した MHV 変異株を単離して，ニルマトレルビルの抗ウイルス活性およびウイルス複製能について検討した。これ

らの変異は SARS-CoV-2 の M^{pro} に導入して生化学的分析を行い，さらに SARS-CoV-2 に組み込んでニルマトレルビルの活性を評価した。次に，SARS-CoV-2 を感染させた P-gp ノックアウト VeroE6 細胞または A549-ACE2 細胞を用い，漸増濃度または一定濃度のニルマトレルビル存在下で継代して耐性ウイルスを単離した。これらの変異株について遺伝子配列を解析し，ウイルス適合性およびニルマトレルビル感受性を評価した。

In vivo 試験は，マウス適合 SARS コロナウイルス SARS-CoV-2-MA10 に感染させたマウスモデルを用いて評価した。本モデルにおける疾患は体重減少および肺病変によって顕在化するため[1,2]，ニルマトレルビルの BID 経口投与による抗ウイルス効果はこれらを指標として BALB/c および 129 マウスを用いて評価した。また，BALB/c マウスではニルマトレルビルとリトナビルの併用効果についても検討した。

ニルマトレルビルの副次的薬理試験および安全性薬理試験は一連の in vitro 試験で評価するとともに，GLP 適用 in vivo 安全性薬理試験としてラットを用いた神経機能および肺機能に関する試験およびサルを用いた心血管系に関する試験を実施した。

ニルマトレルビルの ADME プロファイルを一連の薬物動態試験により明らかにした。ニルマトレルビルの単回投与時における PK は，ラットおよびサルに静脈内あるいは経口投与して評価した。ニルマトレルビルのラットおよびサルを用いた反復経口投与毒性試験におけるトキシコキネティクスデータは，バリデートされた LC-MS/MS 法により得られた。ニルマトレルビルの血漿タンパク結合率および血球移行率は，ラット，ウサギ，サルおよびヒトの血漿または全血を用いて評価した。ニルマトレルビルの代謝を in vitro および in vivo 検体試料を用いて評価した。ニルマトレルビルの投与量に対する排泄率は，ラットまたはサルの尿，胆汁および糞便試料を用いて評価した。また，ニルマトレルビルのヒトにおける主要な薬物代謝酵素の阻害能および誘導能ならびに排出，肝取り込みおよび腎排泄トランスポーターに関する基質性または阻害能について in vitro 試験で評価した。

薬物動態試験の結果によりラット，サルおよびヒトの間でニルマトレルビルの代謝および血漿タンパク結合に類似性が認められたことから，毒性試験に用いる動物種としてラットおよびサルを選択した。なお，ニルマトレルビルの標的はウイルス特異的タンパク質であることおよび実施した副次的薬理試験の結果に基づくとニルマトレルビルがオフターゲット作用を示す可能性は低いことから，薬理学的に毒性試験に適切な動物種は存在しないと考えられる。In vivo 試験での投与経路には，臨床投与経路である経口投与を選択した。

反復投与毒性試験として，ラットおよびサルを用いた 1 ヵ月間までの毒性試験 4 試験を実施した。ラットを用いた受胎能に関する試験，ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験ならびにラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施した。ニルマトレルビルの遺伝毒性については，細菌を用いる復帰突然変異試験，TK6 細胞を用いた in vitro 小核試験およびラット 2 週間反復経口投与毒性試験において実施した in vivo 小核試験により評価した。

ニルマトレルビルとリトナビルの併用投与による毒性試験は実施していない。リトナビルは市販されている薬剤であり，非臨床および臨床における安全性プロファイルが十分に検討されている。ニルマトレルビルの安全性プロファイルは良好であり，ニルマトレルビルおよびリトナ

ビルの間に重複または相加される毒性は予想されていない。さらに，非臨床試験におけるニルマトレルビルの曝露量は臨床用量での曝露量を超えており，広い安全域が確保されている。そのため，ニルマトレルビルとリトナビルを併用投与する毒性試験を実施しても，すでに得られているそれぞれの毒性プロファイル以上の情報は得られないと考えられた。

毒性試験における試験デザインおよび評価したパラメータは，ICH，OECD ガイドラインおよび各国規制（FDA，ECD および本邦の規制当局）に記載されている原則および慣例に準拠した。すべての重要な試験は，特に記載のない限り，OECD データ相互受け入れ制度における加盟国である米国 FDA の GLP 基準に従って実施した。

2. 薬理試験

2.1. 要約

COVID-19 パンデミックの原因病原体である SARS-CoV-2 は，コロナウイルス科に属するウイルスである[3]。SARS-CoV-2 は ACE2 を介して細胞に感染し，主な感染部位は肺および気管支の上皮細胞である [3,4]。SARS-CoV-2 は，他のコロナウイルスと同様に，主要なプロテアーゼである M^{pro} をコードしている[5]。SARS-CoV-2 に近縁の他のコロナウイルスおよびピコルナウイルス（ピコルナウイルス様スーパークラスター）を用いた突然変異誘発試験により，M^{pro}（または対応するピコルナウイルス 3C 酵素）の活性がウイルス複製に不可欠であることが示されている[6]。M^{pro} は，ウイルスの p1a および p1ab ポリタンパク質を複数の接合部位で消化し，RdRp，ヘリカーゼおよび M^{pro} 自体を含むウイルス複製および転写に重要な一連のタンパク質を生成する。コロナウイルスの M^{pro} に近縁のヒト類似体は知られていない[7]。M^{pro} は，ウイルスの複製にとって必須の機能を持つ重要な酵素であり，また，近縁のヒト相同体が存在しないことから，抗ウイルス薬の標的として有望視されている[8]。

ニルマトレルビルは強力（IC_{50} 値 0.0192 µmol/L，K_i 値 0.00311 µmol/L）かつ選択的な SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害薬であり，コロナウイルス科全体の M^{pro} に対して広範な阻害活性を示す。酵素と阻害薬との結合相互作用に関与する重要なアミノ酸残基は，このウイルス科内で特によく保存されている[9]。

ニルマトレルビルの in vitro 抗ウイルス活性は，ACE2 を高発現する正常に分化したアフリカミドリザル腎由来 VeroE6 細胞，ヒト ACE2 を恒常的に発現するヒト腺癌由来肺胞基底上皮細胞（A549-ACE2），胎児肺由来ヒト二倍体細胞（MRC-5）および分化正常ヒト気道上皮（dNHBE）細胞を用いて評価した。これらの細胞を用いた試験において，ニルマトレルビルは SARS-CoV-2 に対して強力な抗ウイルス活性を示した。さらに，ニルマトレルビルは SARS-CoV-1，MERS-CoV および hCoV-229E に対しても活性を有し，コロナウイルス全般に対して有効性を示した。一方，ニルマトレルビルは EV71 および HRV1B に対しては不活性であり，ニルマトレルビルの活性はコロナウイルスファミリーに選択的であることが示されている。

SARS-CoV-2 に対するニルマトレルビルの抗ウイルス活性は数種の細胞株で評価した。そのうち最も生理的に適切と考えられる細胞株は dNHBE 細胞で，これに対する感染後 3 日の EC_{50} 値および EC_{90} 値はそれぞれ 0.0618 および 0.181 µmol/L であった。

P-gp をノックアウトした VeroE6 細胞を用いて各種変異株に対する抗ウイルス活性を検討した結果，ニルマトレルビルはアルファ（B.1.1.7），ガンマ（P.1），デルタ（B.1.617.2），ラムダ

（C.37），ミュー（B.1.621）およびオミクロン（B.1.1.529，BA.1 および BA.2）の各変異株に対して同程度（EC_{50} 値は USA-WA1/2020 株の約 3 倍以内）の抗ウイルス活性を示した。ベータ株（B.1.351，K90R および K90R+P252L 分離株）は最も感受性が低く，EC_{50} 値は USA-WA1/2020 株の 3.7 倍であった。また，デルタ株の臨床分離株 4 株に対しても，ニルマトレルビルは VeroE6 TMPRSS2 細胞を用いた検討で抗ウイルス活性（EC_{50} 値は USA-WA1/2020 株の約 2 倍以内）を示した。さらに，VeroE6 TMPRSS2 細胞および HeLa-ACE2 細胞を用いた検討においてもアルファ，ベータ，デルタおよびオミクロンの各変異株に対して抗ウイルス活性を示した。

10 種類の個々の変異 M^{pro} 遺伝子（G15S，E55L，L89F，K90R，P132H，S144A，E55L+S144A，E166A，Q189K および H164N）を組み込んだ SARS-CoV-2 を作成した。Y54A，F140A，S144E，S144L，S144P，S144T，E166V および H172Y 変異を有する組換えウイルスは作成することができず，これらの変異がウイルス複製に致死的な影響を及ぼす可能性があることと符合した。9 種の組換えウイルスについてニルマトレルビルの活性を検討し，EC_{50} 値を野生型と比較したところ，G15S：0.7 倍，E55L：1.8 倍，L89F：1.3 倍，K90R：1.5 倍，P132H：0.5 倍，S144A：2.5 倍，E166A：3.3 倍，Q189K：0.2 倍，H164N：1.9 倍であった。EC_{50} 値が野生型の 10 倍以内であれば臨床における血中濃度を下回ることから，これらの変異ウイルスはニルマトレルビルに対して感受性を示すものと推測された。したがって，これらの変異の臨床的意義は低いものと考えられた。

P-gp をノックアウトした VeroE6 細胞をニルマトレルビル濃度を漸増させて継代培養したところ，6 種の変異ウイルスが同定された。qPCR 法によって EC_{50} 値の上昇の程度を指標にニルマトレルビルに対する感受性を検討した結果，点変異 T304I で 3.4 倍，二重変異 T21I+T304I，L50F+T304I，T135I+T304I および T304I+A173V でそれぞれ 7.9 倍，5.9 倍，3.8 倍および 20 倍，また三重変異 T21I+T304I+S144A で 28 倍の EC_{50} 値上昇が認められた。二重変異 T304I+A173V および三重変異 T21I+T304I+S144A の EC_{50} 値（それぞれ 20 倍および 28 倍上昇）は臨床でのニルマトレルビル血中濃度を上回った。これら 6 種の変異ウイルスに対するレムデシビルの活性についても検討したところ，EC_{50} 値および EC_{90} 値は野生型と同程度であり，これら変異ウイルスがレムデシビルに対する感受性を保持していることが示された。

A549-ACE2 細胞を用いた検討において，ニルマトレルビル濃度を EC_{50} 値の 25，40 および 50 倍と漸増させたところ，高頻度に認められる M^{pro} 変異として A173V および A173V+F140L の 2 つの変異が選択された。A173V+F140L 変異を有するウイルスの適合性は顕著に低下しており，ウイルス力価は約 2 log_{10} 低下し，プラークのサイズも野生型より小さかった。このように A549-ACE2 細胞では変異ウイルスの増幅の低下が認められたことから，ニルマトレルビル抗ウイルス活性は VeroE6 TMPRSS2 細胞を用いて qPCR 法によって，CP-100356（2.0 µmol/L）の存在下で測定した。A173V 変異のニルマトレルビル感受性は USA-WA1 株と同程度であったが，A173V+F140L 二重変異の感受性は USA-WA1 株と比べて 10 倍低下していたが，このときの EC_{50} 値は臨床での血中濃度より低値であったことから，ニルマトレルビルに対して感受性を有するものと推測されたため，これらの変異の臨床的意義は低いと考えられた。A173V および A173V+F140L の変異はいずれも，レムデシビルに対する感受性は保持していた。

培養細胞より選択されてニルマトレルビル感受性が低下した同様の M^{pro} 変異として T21I+T304I および L50F+E166V が報告されている[10]。これらの変異 M^{pro} を SARS-CoV-2 に組み込んだところ，L50F 単独の変異によるニルマトレルビル感受性の低下は 2.1 倍，T21I+T304I の感受性低下

は 3.0 倍であった。この他，T21I，T304I，A173V および L50F+A173V の変異を構築して組み込んだ時の感受性低下は約 1～3.6 倍で，これらの EC_{50} 値はいずれも臨床血中濃度を下回った。一方，E166V および L50F+E166V 変異による感受性低下はそれぞれ 25 倍および 34 倍で，これらの EC_{50} 値はいずれも臨床血中濃度を上回った。別の報告[11]では，L50F+E166A+L167F の変異によって感受性が 28 倍低下したことが示されており，この EC_{50} 値も臨床血中濃度を上回った。この三重変異ウイルスは，個々の変異を単独で持つウイルス同様に複製能の低下を示した。

以上のように，ニルマトレルビル耐性に関する検討を，変異 M^{pro} を導入するか，あるいは SARS-CoV-2 もしくはそのマウスサロゲートのβコロナウイルスである MHV に感染した細胞をニルマトレルビル濃度を漸増させて培養して選択することによって実施した。他のプロテアーゼ阻害剤を用いた研究からも，ニルマトレルビルとの交叉耐性が報告されている[10,11]。これらの M^{pro} 変異ウイルスのうち，いくつか（Y54A，F140A，S144E，S144L，S144P，S144T，E166V および H172Y）は生存しなかったため評価できなかったが，その他の変異は野生型と比較した EC_{50} 値の上昇の程度によって以下に示す 3 種類に分類された。

- 2 倍未満：G15S，E55L，L89F，K90R，P132H，H164N，A173V および Q189K
- 2～10 倍：S144A，E166A，T304I，T21I+T304I，L50F+T304I，T135I+T304I および A173V+F140L
- 14 倍超：E166V，T304I+A173V，L50F+E166V，T21I+T304I+S144A および L50F+E166A+L167F

M^{pro} におけるほとんどの点変異やいくつかの二重変異によるニルマトレルビル感受性の低下（EC_{50} 値上昇）は野生型の 10 倍以下で，臨床での血中濃度（中央値）以下であったが，三重変異といくつかの二重変異では 14 倍を超える EC_{50} 値の上昇が認められ，臨床での血中濃度を上回った。なお，これらのウイルスは長期間にわたって継代培養されたものであり，その臨床における適合性や自然発生的な耐性との関連は不明である。

マウスに適合させた SARS-CoV-2-MA10 ウイルスに対するニルマトレルビルの in vivo 抗ウイルス効果を BALB/c および 129 系マウスを用いて評価した。ニルマトレルビルの BID 経口投与により，これらのマウスの MA-SARS-CoV-2 感染による体重減少は改善し，肺のウイルス力価が有意に低下した。また BALB/c マウスにおいては，疾患の指標（体重減少および肺の病理組織学的所見）の改善が認められた。ニルマトレルビルが BALB/c マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおいて抗ウイルス効果を示したときの C_{min} はほぼ EC_{90} を維持していた。また，BALB/c マウスにおけるニルマトレルビル単独およびリトナビルとの併用による効果についても検討した。リトナビル単独では抗ウイルス活性を示さなかったが，ニルマトレルビルとの併用により，ニルマトレルビルまたはリトナビル単独と比較して肺保護作用の改善が認められた。これはリトナビルの CYP3A 阻害によりニルマトレルビルの曝露量が増加したことによると考えられる。

副次的薬理試験において，ニルマトレルビルは in vitro でオフターゲットの薬理活性を示さなかった。

安全性薬理試験を in vitro，ex vivo および in vivo で実施した結果，ニルマトレルビルは重要な器官（中枢神経系，呼吸系および心血管系）の生理機能に対して臨床的に意義のある作用を示さなかった。

ニルマトレルビルの主な酸化代謝物である PF-07329268（M4）の薬理活性についても in vitro で評価したが，ヒトにニルマトレルビルとリトナビルを併用したときの M4 レベルはわずかであったことから，臨床においてはニルマトレルビルの薬理活性に対する M4 の寄与は低いと考えられる。

2.2. 効力を裏付ける試験

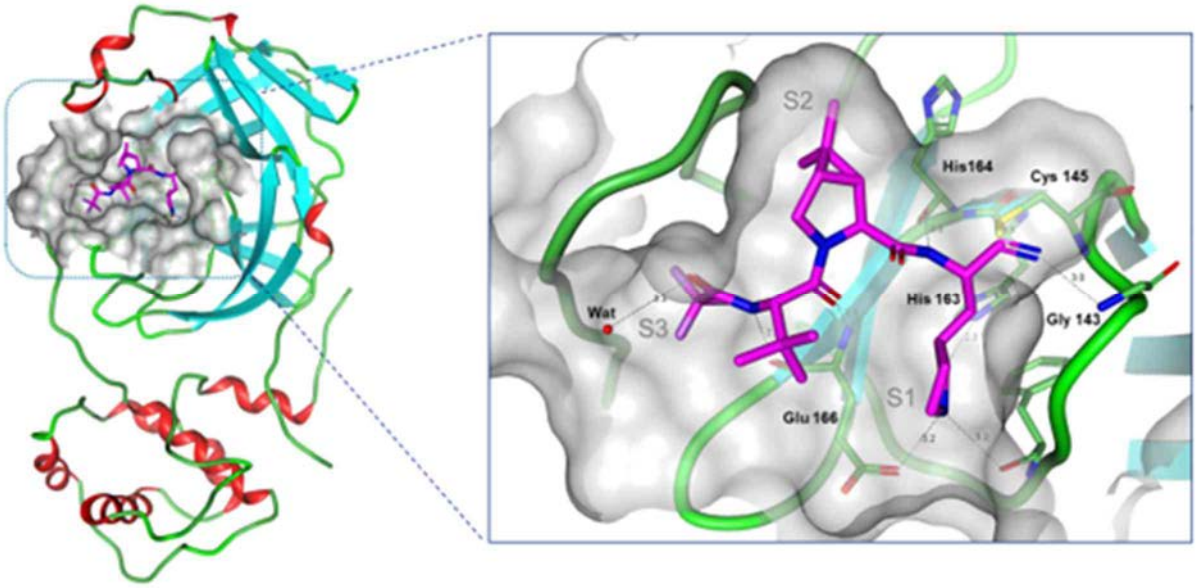
2.2.1. In vitro 試験

2.2.1.1. 作用機序

ニルマトレルビルの作用機序は，様々な生化学的，結晶学的および細胞を用いた方法によって示されている。ニルマトレルビルは完全長SARS-CoV-2 M^{pro}の酵素活性を阻害し，IC_{50}の幾何平均値は0.0192 µmol/L，K_iの幾何平均値は0.00311 µmol/Lであった。ニルマトレルビルの主要酸化代謝物であるPF-07329268もSARS-CoV-2 M^{pro}を強力に阻害し，IC_{50}の幾何平均値は0.0175 µmol/L，K_iの幾何平均値は0.00315 µmol/Lであった。また，PF-07321332はSARS-CoV-1およびHCoV-229EのM^{pro}もそれぞれ0.0289および0.113 µmol/LのIC_{50}値で阻害した（PF-07321332_[redacted]_090608試験，PF-07321332_[redacted]_091415試験）。
M^{pro} はすべてのコロナウイルスの複製サイクルにおいて不可欠な役割を担っていることから [6]，FRET 法によるプロテアーゼ活性アッセイを用いて，他のヒトコロナウイルス（β コロナウイルス属の MERS，HCoV-OC43 および HCoV-HKU1，ならびに α コロナウイルス属の HCoV-229E および HCoV-NL63）の M^{pro} に対するニルマトレルビルの活性を評価した。その結果，ニルマトレルビルはこれらのウイルスに対して 0.0391～0.479 µmol/L の IC_{50} 値で活性を示し，α および β コロナウイルス属に対し広範な阻害活性を有することが確認された（PF-07321332_[redacted]_091415 試験）。

共結晶構造により示されるように，PF-07321332 は SARS-CoV-2 M^{pro} の活性部位に結合し，M^{pro} とニルマトレルビルとの間に共有結合性相互作用を形成する（C-S 結合長は 1.90 Å）（Figure 1，PF-07321332_[redacted]_054343 試験）。PF-07321332 の結合様式は基質結合を模倣しており，酵素と基質の接触に類似する多くのタンパク質相互作用を形成する [9]。

Figure 1.　SARS-CoV-2 M^{pro} に結合するニルマトレルビルの共結晶構造



ニルマトレルビルは SARS-CoV-2 Mpro の基質部位と結合し，触媒システイン残基（Cys 145）と共有結合性相互作用を形成する。さらに，ニルマトレルビルは活性部位の S1，S2 および S3 部位の結合ポケットを占有する。リガンドと水素結合相互作用（破線）を形成する残基を標識している（PF-07321332_[redacted]_054343 試験）。

ニルマトレルビルがSARS-CoV-2 M^{pro}と結合している共結晶構造から，M^{pro}の活性部位に，M^{pro}とニルマトレルビルとの間に共有結合または水素結合を形成する6個の接触残基が特定された（PF-07321332_[redacted]_054343試験）。ニルマトレルビル結合部位から5 Å以内の残基を検討したところ，必須残基である可能性がある9個の残基がさらに特定された。これらの接触残基の保存度を，GISAIDに基づいて既存の広範な完全長および高カバレッジSARS-CoV-2ゲノムと比較することにより評価した（n = 7,404,748，最終評価日2022年4月30日）。なお，この解析は現在流行しているウイルスに関するデータを提供するものであるが，これは有病率に基づいた解析ではなく，日常的に分離株のシークエンシングが行われている地域によりバイアスを受けていることに注意する必要がある。検討した15残基は高度に保存されており，突然変異の頻度は0.017%未満であった。アミノ酸残基，突然変異およびその頻度の一覧をTable 1に示す。ニルマトレルビルが広範なコロナウイルスM^{pro}に対して阻害作用を示すのは，コロナウイルス科全体にわたってM^{pro}が類似していることによると考えられる。全体としての配列の類似性はわずかであるが，M^{pro}の活性部位の残基はすべてのヒトコロナウイルスではるかに高度に保存されている（PF-07321332_[redacted]_120222試験）。

Table 1.　SARS-CoV-2 Mpro の主なニルマトレルビル接触残基における変異

残基の位置	アミノ酸残基	変異	ニルマトレルビルとの相互作用
41	His (H)	H41Y, H41L	触媒部位，疎水性接触
49	Met (M)	M49I, M49K, M49L, M49T, M49V	側鎖疎水性接触
54	Tyr (Y)	Y54*	ニルマトレルビル近接（Gln189 ループを安定化し，酵素活性に影響を及ぼす）
140	Phe (F)	F140L	主鎖水素結合
143	Gly (G)	G143S, G143C	主鎖水素結合
145	Cys (C)	C145I, C145F, C145Y	触媒部位（共有結合）
163	His (H)	なし	側鎖水素結合
164	His (H)	H164N	主鎖水素結合
165	Met (M)	M165I, M165K, M165L, M165T, M165V	側鎖疎水性接触
166	Glu (E)	E166G	主鎖および側鎖接触
167	Leu (L)	L167*, L167I, L167S	側鎖疎水性接触
168	Pro (P)	P168S, P168R, P168A, P168T	側鎖疎水性接触
172	His (H)	H172D, H172E, H172Y	ニルマトレルビル近接（Glu166 および Phe140 を安定化し，酵素活性に影響を及ぼす）
189	Gln (Q)	Q189*, Q189G, Q189H, Q189K, Q189L, Q189P	ニルマトレルビル近接（基質ペプチドと相互作用）
192	Gln (Q)	Q192K, Q192L	ニルマトレルビルの側鎖水素結合に近接（Gln189 ループおよび基質結合ポケットを安定化）

* 終止コドンを形成する変異
PF-07321332_[redacted]_120222 試験

2.2.1.2. ニルマトレルビルの選択性

種々のヒト，哺乳類およびウイルスのプロテアーゼ（主にシステインプロテアーゼおよびセリンプロテアーゼ酵素）ならびに非近縁ウイルスである HIV-1 のプロテアーゼと比較して，SARS の M^{pro} に対するニルマトレルビルの選択性を検討した（PF-07321332_[redacted]_091415 試験）。その結果，ニルマトレルビルの SARS-CoV-2 M^{pro} に対する選択性（IC_{50} = 0.0192 µmol/L）は，ヒト細胞プロテアーゼおよび HIV プロテアーゼと比較すると 521 倍超であることが示された。

さらに，ニルマトレルビルは EV71 および HRV1B ウイルス誘導性 CPE を阻害せず（EC_{50} > 100 µmol/L），検討した最高濃度（100 µmol/L）までいずれの細胞に対しても細胞毒性を示さなかった（CC_{50} > 100 µmol/L）（PF-07321332_[redacted]_041406 試験）。

2.2.1.3. ニルマトレルビルの抗ウイルス活性

ACE2 を高発現させた VeroE6 細胞を用いた CPE アッセイで，ニルマトレルビルおよびその主要酸化代謝物（PF-07329268）の SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス活性を評価した

（PF-07321332_[redacted]_052017 試験）。また，非感染 VeroE6 細胞を用いてニルマトレルビルの細胞毒性を評価した。ニルマトレルビルは P-gp の基質となることから，生理学的により適切な細胞となるよう，P-gp 阻害薬である CP-100356 を用いて VeroE6 細胞に高発現している P-gp を抑制した。すなわち，被験物質の評価は CP-100356 の存在下または非存在下で実施した。

ニルマトレルビルは CP-100356 の存在下で SARS-CoV-2 による CPE を阻害し，EC_{50} 値は 0.0745 µmol/L，EC_{90} 値は 0.155 µmol/L であった。一方，CP-100356 非存在下での抗ウイルス活性はこれより約 60 倍弱かった。細胞毒性は，100 µmol/L の濃度まで，2.0 µmol/L の CP-100356 存在下または非存在下のいずれでも認められなかった。SARS-CoV-2 に対する TI は，2.0 µmol/L の CP-100356 存在下で 1250 超であった。

PF-07329268 の CP-100356 存在下における EC_{50} 値は 0.69 µmol/L（ニルマトレルビルの効力の 9 分の 1），EC_{90} 値は 1.44 µmol/L で，細胞毒性は 3 µmol/L の濃度まで認められなかった。

リトナビルはニルマトレルビルの CYP3A を介した代謝を阻害して，その血漿中濃度を増加させることから，臨床ではニルマトレルビルとリトナビルが併用される。そのため，ニルマトレルビル，リトナビルおよび両者の併用による SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス活性について，ACE2 を発現する A549 細胞を用いて評価した（PF-07321332_[redacted]_041209 試験）。また，非感染の A549-ACE2 細胞におけるニルマトレルビルとリトナビルの細胞毒性も評価した。ニルマトレルビとリトナビルの相互作用を検討するため，併用試験は様々な濃度を用いて実施したが，後述するようにリトナビルは 3 µmol/L までの濃度で抗ウイルス作用を示さなかったため，固定濃度のリトナビルを用いてニルマトレルビルの抗ウイルス活性に対する影響を検討することとした。

ニルマトレルビルは A549-ACE2 細胞において SARS-CoV-2 ウイルス複製を阻害し，その EC_{50} 値は 0.0779 µmol/L，EC_{90} 値は 0.215 µmol/L であった。リトナビルは，A549-ACE2 細胞において検討した最高濃度（3 µmol/L）までウイルス複製に影響を及ぼさなかった。ニルマトレルビルおよびリトナビルは A549-ACE2 細胞に対して 3 µmol/L までの濃度で細胞毒性を示さなかった。ニルマトレルビルの存在下でリトナビルの濃度を増加させても，ニルマトレルビル単独と比べてウイルス複製阻害作用は増強されなかったことから，リトナビルはニルマトレルビルの存在の有無にかかわらず SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス活性を有しないことが示された。

dNHBE 細胞の SARS-CoV-2 感染に対するニルマトレルビルおよびレムデシビルの抗ウイルス活性を評価した（PF-07321332_[redacted]_010204 試験）。ウイルス感染と同時に薬物処理を開始して感染後 3 日および 5 日に dNHBE 細胞から感染子孫ウイルスを回収し，CPE に基づいた Vero76 細胞の $CCID_{50}$ アッセイによって複製可能なウイルスを定量した。感染後 3 日および 5 日におけるニルマトレルビルの抗ウイルス活性の EC_{50} 幾何平均値はそれぞれ 0.0618 および 0.0326 µmol/L，EC_{90} 幾何平均値はそれぞれ 0.181 および 0.0561 µmol/L であった。レムデシビルの EC_{50} 値は，同様の試験系で報告されている値と同様であった。

ACE2 を発現する VeroE6 細胞を用いた CPE アッセイで SARS-CoV-1 に対するニルマトレルビルの抗ウイルス活性を CP-100356 の存在下および非存在下で評価した（PF-07321332_[redacted]_104426 試験）。ニルマトレルビルの SARS-CoV-1 による CPE に対する EC_{50} 値は CP-100356 の非存在下で 12.3 µmol/L，存在下で 0.151 µmol/L であった。細胞毒性は CP-

100356 の有無に関わらず 100 µmol/L までの濃度で認められなかった。SARS-CoV-1 に対する CP-100356 存在下での TI は 756 超であった。

MRC-5 細胞を用いた CPE アッセイで，HCoV-229E に対するニルマトレルビルの抗ウイルス活性も評価した（PF-07321332_[redacted]_092314 試験）。ニルマトレルビルはウイルスによる CPE を阻害し，EC_{50} 値は 0.190 µmol/L，EC_{90} 値は 0.620 µmol/L であった。また，MRC-5 細胞に対する細胞毒性の CC_{50} は 100 µmol/L 超であった。MRC-5 細胞におけるニルマトレルビルの TI は 567 超であった。

さらに，Vero81 細胞を用いた CPE アッセイでニルマトレルビルの MERS-CoV に対する抗ウイルス活性を CP-100356 の存在下および非存在下で評価した（PF-7321332_[redacted]_015423 試験）。ニルマトレルビルは MERS-CoV による CPE を CP-100356 非存在下では 5.41 µmol/L の EC_{50} 値で，存在下では 0.166 µmol/L の EC_{50} 値で阻害した。細胞毒性は CP-100356 の有無に関わらず 100 µmol/L までの濃度で認められず，CP-100356 存在下での MERS-CoV に対する TI は 623 超であった。

2.2.1.4. SARS-CoV-2 の主要変異株に対する作用

P-gp をノックアウトした VeroE6 細胞を用いた CPE アッセイで，ニルマトレルビルは，USA-WA1/2020 株ならびにそのアルファ，ベータ，ガンマ，ラムダおよびミュー変異株による CPE をそれぞれ 108，75.3，171，87.7，59.5 および 65.1 nmol/L の EC_{50} 値で阻害した（PF-07321332_[redacted]_104040 試験）。数種のデルタ変異株についても P-gp ノックアウト VeroE6 細胞で検討したが，CPE を生じなかったため，CPE アッセイによる EC_{50} 値を得ることができなかった。P-gp ノックアウト VeroE6 細胞のウイルス量に対するニルマトレルビルの作用の測定には qPCR 法も用いた。その結果，ニルマトレルビルは USA-WA1/2020 株ならびにそのアルファ，ベータ K90R+P252L，ガンマ，ラムダ，デルタ，ミュー，オミクロン BA.1 およびベータ K90（流行しているベータ変異株）の各変異株に対し，それぞれ 38，41，127.2，24.9，21.2，15.9，25.7，16.2 および 141 nmol/L の EC_{50} 値で阻害作用を示した（PF-07321332_[redacted]_042713 試験）。

デルタ変異株による CPE は TMPRSS2 を発現する VeroE6 細胞では検出されたため，この細胞株を用いて USA-WA1/2020 株ならびにそのアルファ，ベータ K90R+P252L，ガンマ，ラムダ，デルタおよびミュー変異株に対するニルマトレルビルの抗ウイルス活性を検討した。VeroE6 TMPRSS2 細胞を用いた CPE アッセイにおいて，ニルマトレルビルは CP-100356（2.0 µmol/L）の存在下で各ウイルス株に対してそれぞれ 92.8，170，217，204，93.0，82.2，および 138 nmol/L の EC_{50} 値で阻害作用を示した（PF-07321332_[redacted]_104040 試験）。オミクロン BA.2 株を用いた別の試験では，ニルマトレルビルは USA-WA1/2020 株およびオミクロン BA.2 株に対してそれぞれ 130 および 79 nmol/L の EC_{50} 値を示した。

懸念される変異株であるアルファ，ベータ，デルタおよびオミクロン株に対するニルマトレルビルの抗ウイルス活性を HeLa-ACE2 細胞および VeroE6 TMPRSS2 細胞を用いた免疫染色法によって検討した。MTT 法を用いて細胞毒性も同時に評価した。ニルマトレルビルの USA-WA1/2020 株に対する IC_{50} 値は HeLa-ACE2 細胞および VeroE6 TMPRSS2 細胞でそれぞれ 207 および 38 nmol/L で，アルファ，ベータ，デルタおよびオミクロン株に対してはそれぞれ 70～225 および 22～121 nmol/L の IC_{50} 値を示した（PF-07321332_[redacted]_091706 試験）。

デルタ変異株の臨床分離株 4 株に対するニルマトレルビルの抗ウイルス活性を VeroE6 TMPRSS2 細胞を用いて検討した。対照株として USA-WA1/2020 株を用いた。ニルマトレルビルは CP-100356（2.0 µmol/L）の存在下で USA-WA1/2020 株ならびにデルタ株の臨床分離株 CVD198，CVD202，CVD204 および CVD205 に対してそれぞれ 103.2，221.1，157.4，147.9 および 111.2 nmol/L の EC_{50} 値で阻害作用を示した。臨床分離株に対する EC_{50} 値は対照株の約 2 倍以内であった（PF-07321332_[redacted]_012142 試験）。

2.2.1.5. 変異 SARS-CoV-2 M^{pro} 酵素に対するニルマトレルビルの作用

連続 FRET アッセイを用いて，変異 SARS-CoV-2 M^{pro} 酵素についてニルマトレルビル存在下での酵素活性（K_i 値）を評価し，触媒効率（k_{cat}/K_m）を野生型（USA-WA1/2020 株）SARS-CoV-2 M^{pro} 酵素と比較した（PF-07321332_[redacted]_121015 試験）。特に，ニルマトレルビル接触残基の点変異，流行ウイルスにおける最も頻度の高い変異，C4671005（EPIC-HR）臨床試験で検出された変異，または SARS-CoV-2 のマウスサロゲートウイルスである MHV の耐性試験（2.6.2.2.2.1.7 項）で認められた変異について評価した。なお，これらの M^{pro} 多型の臨床的意義は不明であり，これらの生化学的アッセイの結果が細胞における抗ウイルス活性を予測させるものであるか否かも不明である。

検討した M^{pro} 変異のうち，16 種類（Y54A，F140A，F140L，S144A，S144E，S144T，S144A+E55L，H164N，E166A，E166G，H172Y，A173V，V186G，Q189K，Q192L および Q192P）でニルマトレルビルの活性（Ki 値）が野生型と比べて 5 倍以上低下し，ウイルスの複製能に影響すると推測された。このうち S144A および S144A+E55L は耐性 MHV から in vitro で選択され，ニルマトレルビルの活性（K_i 値）はそれぞれ 85.7 および 94.2 nmol/L であった。qPCR 法によって測定した EC_{50} 値は野生型のそれぞれ 2.5 倍および 1.8 倍で，臨床における薬物濃度よりは低かったことから，これらの変異はニルマトレルビルに対して野生型と同程度の感受性を持つと考えられた。S144E，S144T および A173V に対するニルマトレルビルの K_i 値はそれぞれ 438，151 および 24.5 nmol/L であったが，このうち qPCR 法による A173V に対する EC_{50} 値は野生型の 0.9 倍であった。G15S，T45I，P108S，T135I，A234V および D248E は自然発生する M^{pro} 変異として検出されているが，K_i 値の変化は 5 倍未満であった。

C4671005（EPIC-HR）臨床試験より A260V と A260T の 2 種の変異が同定された。これらは自然発生多型であり，公表されている SARS-CoV-2 の配列において 0.2%未満の頻度で認められている 。このうち A260V 置換はニルマトレルビルの活性を低下させなかった（K_i 値の変化は 1 倍未満）ことから，この変異 を有するウイルス株に対するニルマトレルビルの活性は低下しないものと予測される。

2.2.1.6. 組換え SARS-CoV-2 に対するニルマトレルビルの作用，ウイルス適合性および耐性の in vitro 評価

In vitro で選択されたか，M^{pro} 活性に影響を及ぼすと考えられた MHV および SARS-CoV-2 の変異 M^{pro} を SARS-CoV-2 に組み込んで，ウイルス適合性およびニルマトレルビルの抗ウイルス活性について検討した（PF-07321332_[redacted]_024518 試験）。

10 種類の個々の変異 M^{pro} 遺伝子（G15S，E55L，L89F，K90R，P132H，S144A，E55L+S144A，E166A，Q189K および H164N）を組み込んだ SARS-CoV-2 を作成した。Y54A，F140A，

S144E，S144L，S144P，S144T，E166V および H172Y 変異を有する組換えウイルスは作成することができず，これらの変異がウイルス複製に致死的な影響を及ぼす可能性があることと符合した。9 種の組換えウイルスについてニルマトレルビルの活性を検討し，EC_{50} 値を野生型と比較したところ，G15S：0.7 倍，E55L：1.8 倍，L89F：1.3 倍，K90R：1.5 倍，P132H：0.5 倍，S144A：2.5 倍，E166A：3.3 倍，Q189K：0.2 倍，H164N：1.9 倍であった。EC_{50} 値が野生型の 10 倍以内であれば臨床における血中濃度を下回ることから，これらの変異ウイルスはニルマトレルビルに対して感受性を示すものと推測された。これらの 9 種の変異ウイルスはレムデシビルに対しても感受性を有していた。

2.2.1.7. MHV ウイルスを用いた in vitro 耐性ウイルス選択試験

培養細胞を用い，培地中のニルマトレルビル濃度を漸増させることによって MHV の耐性ウイルスを選択した（PF-07321332_[redacted]_035634 試験）。

MHV に感染させた L929 細胞をニルマトレルビル濃度を EC_{50} 値の 30 倍または 40 倍まで漸増させて継代培養したところ，M^{pro} 遺伝子に P55L および S144A，またこれらよりは低頻度ながら T129M，T50K および P15A の変異が認められた（頻度は 4.6%未満）。これらの変異ウイルスの複製能は親株 MHV と比較して 1～2 $\log_{10}$ PFU/mL の低下を示した。ニルマトレルビルはこれらの変異 MHV に対しても活性を保っており，EC_{50} 値は野生型の 4.4～4.9 倍高値であった。S144A 変異を SARS-CoV-2 に組み込んだ試験（2.4.2.2.1.6 項）では，ニルマトレルビルの活性は 2.5 倍低下し，ウイルス適合性も MHV と同様に低下した。EC_{50} 値の 50 倍（継代 11 代目）では CPE は観察されず，qPCR 分析で複製ウイルスが存在しないことが確認されたことから，この濃度における変異 MHV のニルマトレルビル感受性が示された。これらの変異の臨床的意義は不明であるが，これらの結果から，in vitro 実験条件下において，MHV のニルマトレルビル耐性は薬物濃度を漸増させる継代培養によって発現し，選択されたニルマトレルビル耐性ウイルスは，ウイルス適合性が低下することが示された。Deng らの報告[12]では，広範な M^{pro} 阻害薬に対する MHV 耐性株の選択の結果から，M^{pro} の変異はウイルスの耐性と関連しているものの，耐性ウイルスの細胞培養におけるウイルス適合性は低下し，マウスでは顕著に弱毒化したことが示されている。これは，M^{pro} の本質的な機能がウイルス適合性と薬剤耐性のバランスに影響することを示している。

2.2.1.8. SARS-CoV-2 ウイルスを用いた in vitro 耐性ウイルス選択試験

P-gp ノックアウト Vero E6 細胞および A549-ACE2 細胞を用いて SARS-CoV-2 の耐性ウイルスを選択した。

P-gp ノックアウト Vero E6 細胞を用いた検討では，ニルマトレルビル濃度は EC_{50} 値の 1 倍から開始し，耐性変異ウイルスを増幅させるために薬物濃度を漸増させた。感染細胞を継代する毎に単離ウイルスについてディープシーケンシングを実施し，別の細胞に感染させた。5 系統の細胞を用いた 9 代までの継代より検出された M^{pro} 変異およびそれらのニルマトレルビル感受性（EC_{50} 値の野生型に対する倍率）は T304I（3.4 倍），T21I+T304I（7.9 倍），L50F+T304I（5.9 倍），T135I+T304I（3.8 倍），T304I+A173V（20 倍）および T21I+T304I+S144A（28 倍）であった（PF-07321332_[redacted]_113117 試験）。このうち最初に検出されたのは T304I で，その後の継代でその他の二重変異あるいは三重変異が認められた。T304I のみの変異ではニルマトレルビル感受性は野生型の 3.4 倍低下したが，これに T135I が加わった T304I+T135I も野生型の

3.8 倍低下と同程度のニルマトレルビル感受性を示した。T304I に L50F または T21I が加わった T304I+L50F および T304I+T21I では感受性がさらに低下し，EC_{50} 値は野生型のそれぞれ 5.9 倍および 7.9 倍であった。S144A 変異単独による感受性低下は 2.5 倍であったが（2.4.2.2.1.6 項），T304I+T21I にこれが加わった三重変異 T21I+T304I+S144A では感受性が 28 倍低下した。また，T304I に A173V が加わった T304T+A173V では感受性が 20 倍低下した。これらの三重変異 T21I+T304I+S144A および二重変異 T304T+A173V に対するニルマトレルビルの EC_{50} 値は臨床における血中濃度を上回った。なお，本試験で単離された 6 種の変異ウイルスはいずれもレムデシビルに対する感受性は保持しており，複製能も良好であったことから，これらの M^{pro} 変異はレムデシビル感受性やウイルス適合性には影響しないことが示された。

次に，A549-ACE2 細胞を用いてニルマトレルビル耐性ウイルス選択試験を実施した。ニルマトレルビルの開始濃度は EC_{50} 値の 6 倍として濃度を漸増させたところ，25，40 および 50 倍の濃度で高頻度に認められる M^{pro} 変異として A173V および A173V+F140L の 2 つの変異が選択された（PF-07321332_[redacted]_065112 試験）。A173V 変異は 3，4 および 5 代目の継代で，A173V+F140L 二重変異は 6 および 7 代目の継代で認められた。A173V+F140L 変異を有するウイルスの適合性は顕著に低下しており，ウイルス力価は約 2 log_{10} 低下し，プラークのサイズも野生型より小さかった。このように A549-ACE2 細胞では変異ウイルスの増幅の低下が認められたことから，ニルマトレルビル抗ウイルス活性は VeroE6 TMPRSS2 細胞を用いて qPCR 法によって，CP-100356（2.0 µmol/L）の存在下で測定した。A173V 変異のニルマトレルビル感受性は USA-WA1 株と同程度であったが，A173V+F140L 二重変異の感受性は USA-WA1 株と比べて 10 倍低下しており，このときの EC_{50} 値は臨床での血中濃度より低値であったことから，ニルマトレルビルに対して感受性を有するものと推測された。A173V および A173V+F140L の変異はいずれも，レムデシビルに対する感受性は保持していた。

培養細胞より選択されてニルマトレルビル感受性が低下した同様の M^{pro} 変異として T21I+T304I および L50F+E166V が報告されている [10]。これらの変異 M^{pro} を SARS-CoV-2 に組み込んだところ，L50F 単独の変異によるニルマトレルビル感受性の低下は 2.1 倍，T21I+T304I の感受性低下は 3.0 倍であった。この他，T21I，T304I，A173V および L50F+A173V の変異を構築して組み込んだ時の感受性低下は約 1～3.6 倍で，これらの EC_{50} 値はいずれも臨床血中濃度を下回った。一方，E166V および L50F+E166V 変異による感受性低下はそれぞれ 25 倍および 34 倍で，これらの EC_{50} 値はいずれも臨床血中濃度を上回った。E166V または A173V 変異を有するウイルスでは適合性が低下したが，これに L50F 変異が加わると複製能が回復した。別の報告 [11] では，L50F+E166A+L167F の変異によって感受性が 28 倍低下したことが示されており，この EC_{50} 値も臨床血中濃度を上回った。この三重変異ウイルスは，個々の変異を単独で持つウイルス同様に複製能の低下を示した。これらのウイルスは長期間にわたって継代培養されたものであり，その臨床における適合性や自然発生的な耐性との関連は不明である。

2.2.2. In vivo 試験

ニルマトレルビルの in vivo 試験は，SARS-CoV-2 のマウス適合型ウイルスである SARS-CoV-2-MA10 を BALB/c および 129 マウスに感染させて実施した。

2.2.2.1. Balb/c マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおける in vivo 作用

BALB/c マウスに SARS-CoV-2-MA10 ウイルスを鼻腔内接種した。独立した 2 回の試験で，ニルマトレルビルを 0（溶媒），300 または 1000 mg/kg BID の用量で，感染 4 時間後から 4 日間，計 8 回経口投与した。マウスの体重を試験 0 日から毎日測定し，感染に関連した体重減少を評価した。ニルマトレルビルの in vivo におけるウイルス複製阻害を評価するため，試験 4 日の肺ウイルス力価を $CCID_{50}$ アッセイにより測定し，病理組織学的検査および免疫組織化学的検査も実施した（PF-07321332_[redacted]_105036 試験）。2 回の試験から類似した結果が得られたため，データを併合して 12 匹/群として評価した。

ニルマトレルビルは 300 または 1000 mg/kg の経口投与でマウスの体重減少を有意に抑制し（それぞれ $p<0.01$ または $p<0.001$），また肺ウイルス力価をそれぞれ 1.39 log_{10}（$p<0.0001$）または 1.91 log_{10}（$p=0.002$）低下させた。

本試験における非結合型血中濃度を in vitro での SARS-CoV-2 に対する EC_{90} 値である約 181 nmol/L（薬物処置開始から 3 日後；PF-07321332_[redacted]_010204 試験）と比較した。BALB/c マウスでのニルマトレルビルの非結合型 C_{min} は 300 および 1000 mg/kg BID で EC_{90} 値のそれぞれ約 0.9 倍および約 4 倍であったことから，ニルマトレルビルが SARS-CoV-2 のマウス適合モデルにおいて C_{min} をほぼ EC_{90} 値に維持することで抗ウイルス作用を発揮することが示された。

ニルマトレルビルはウイルス複製による損傷から肺組織を保護し，細胞浸潤を抑制することが示された。対照群のマウスから採取した肺の病理組織学的検査において，ニルマトレルビル投与群および模擬感染群と比較して，血管周囲炎症の増加，気管支上皮または細気管支上皮の変性または壊死，気管支または細気管支炎症，肺胞内腔の細胞残屑，肺胞中隔の炎症および肥厚が認められた。感染マウスの大部分は多巣性の肺病変を示したが，ニルマトレルビルを投与したマウスでは肺病変の発生率は顕著に低下した。さらに，免疫組織化学的検査より，SARS-CoV-2 感染の程度（N-タンパク質抗原を指標とする）が病理組織学的スコアと相関すること，およびニルマトレルビルに関連する肺の変化が肺のウイルス感染の減少と相関することが示された。

2.2.2.2. Balb/c マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおけるニルマトレルビル，リトナビルおよび両者の併用による in vivo 作用

SARS-CoV-2-MA10 ウイルスを鼻腔内接種した BALB/c マウスにニルマトレルビル（300 mg/kg BID），リトナビル（50 mg/kg BID）または両者の併用による抗ウイルス作用を評価した。2 回の独立した試験を実施し，それぞれ感染 4 時間後から経口投与を開始した（6 匹/群）。試験 4 日の肺ウイルス力価を $CCID_{50}$ アッセイにより測定し，病理組織学的検査も実施した（PF-07321332_[redacted]_092629 試験）。2 回の試験から類似した結果が得られたため，一部のデータは併合して 12 匹/群として評価した。

ニルマトレルビル（300 mg/kg BID）は単独で $CCID_{50}$ アッセイにより測定したウイルス力価を 1.2 log_{10} 減少させた（併合データ）が，リトナビル（50 mg/kg BID）単独ではウイルス力価の減少はみられなかった。ニルマトレルビルとリトナビルの併用ではウイルス力価に 1.6 log_{10} の減

少（併合データ）が認められた。疾患の指標である病理組織学的スコアについては，各薬物の単独投与群では変化がみられなかったが，併用投与群で統計的に有意な改善が認められた。

本試験における非結合型血中濃度を in vitro での SARS-CoV-2 に対する EC_{90} 値である約 181 nmol/L（薬物処置開始から 3 日後；PF-07321332_[redacted]_010204 試験）と比較した。ニルマトレルビル単独投与時のニルマトレルビルの C_{min} は 2 回の試験で EC_{90} 値のそれぞれ 0.9 倍および 2.9 倍，リトナビルとの併用時の C_{min} は 2 回の試験で EC_{90} 値のそれぞれ 8 倍および 28 倍であった。

これらの結果から，前項（2.4.2.2.2.1 項）に示した SARS-CoV-2-MA10 ウイルス感染 BALB/c マウスにおけるニルマトレルビルの抗ウイルス活性が確認された。また，リトナビル単独ではウイルス複製や病理組織学的スコアに対して改善効果を示さなかった。ニルマトレルビルとリトナビルの併用により，各薬物の単独投与と比較して肺組織に対する保護効果が改善したが，これはリトナビルの CYP3A 阻害によりニルマトレルビルの曝露量が増加したことによると考えられる。

2.2.2.3. 129 マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおける in vivo 作用

ニルマトレルビルの抗ウイルス効果は，SARS-CoV-2-MA10 ウイルスを 129 マウスに鼻腔内接種した SARS-CoV-2 マウス感染モデルでも評価した。ニルマトレルビルを 0（溶媒），300 または 1000 mg/kg BID の用量で感染後 4 時間から 3 日間，計 6 回投与した（6 匹/群）。さらに 1000 mg/kg BID 群を追加し，感染後 12 時間から計 5 回投与した。 マウスの体重を試験 0 日から毎日測定し，感染に関連した体重減少を測定した。ニルマトレルビルの in vivo におけるウイルス複製阻害を評価するため，試験 3 日の肺ウイルス力価を $CCID_{50}$ アッセイにより評価した（PF-7321332_[redacted]_022652 試験）。

溶媒対照群では約 9%の体重減少がみられたのに対し，300 mg/kg BID での体重減少は約 6%であった。1000 mg/kg BID では体重減少は約 2%で，感染後も基本的に体重が維持された。

感染後 3 日目に肺のウイルス力価を評価した。300 mg/kg BID の用量では，溶媒投与群と比較して 1.1 log_{10} ウイルス力価が低下し，疾患の指標である体重減少が改善した。感染後 4 時間または 12 時間より 1000 mg/kg BID のニルマトレルビル投与を開始した群では，いずれも溶媒投与群と比較して約 4 log_{10}，肺ウイルス力価が有意に低下した（$p<0.001$）。

2.3. 副次的薬理試験

安全性上の懸念が示唆されている標的（G タンパク質共役型受容体，イオンチャネル，トランスポーターおよび酵素など）を含む広範な標的に対する作用（適用濃度 100 µmol/L），11 種類の PDE サブタイプに対する阻害（同最大 200 µmol/L）ならびに Nav1.5 ナトリウムチャネルおよび Cav1.2 カルシウムチャネルの電流に対する阻害（同最大 300 µmol/L）に関し，ニルマトレルビルはいずれもオフターゲット作用を示さなかった（100054569，[redacted]LJ074 および [redacted]LJ073 試験）。これら試験での適用濃度はヒトにニルマトレルビル/リトナビルを 300/100 mg の用量で BID 投与したときの非結合型 C_{max} の約 50～150 倍であった。

2.4. 安全性薬理試験

Table 2に示す一連の安全性薬理試験をin vitro，ex vivoおよびin vivoで実施した結果，ニルマトレルビルは重要な器官（中枢神経系，呼吸系および心血管系）の生理機能に対して臨床的に意義のある作用を示さなかった。安全性薬理試験での所見は，高用量群のラットで認められた自発運動量の変化ならびに一過性の呼吸数および分時換気量の増加（曝露比：総濃度C_{max}に基づく臨床曝露量の23倍），高用量群のカニクイザルで認められた軽微かつ一過性の血行動態の変化（血圧上昇および心拍数減少）（曝露比：同4.7倍）であった。ラットまたはサルを用いた1ヵ月間までのGLP適用反復投与毒性試験では，関連する一般状態の変化および該当する臓器の病理組織学的所見は認められていない（2.4.4.3項，[redacted]GR276，[redacted]GR289，[redacted]GR122および[redacted]GR125試験）。サルを用いた15日間および1ヵ月間投与試験では心電図データも収集しており，この試験では，心電図パラメータ（心拍数ならびにRR，PR，QRS，QTおよびQTc間隔）または心電図波形の変化は認められていない。

Table 2.　ニルマトレルビルの安全性薬理試験の概要

試験	試験番号（ファイザー社試験番号）	濃度または用量	GLP
In vitro 試験			
hERG 阻害能評価	[redacted]LJ022	30 µmol/L, 300 µmol/L	適用
モルモット摘出ランゲンドルフ灌流心モデルにおける心機能および心伝導に対するニルマトレルビルの影響	[redacted]LJ075	0.03 µmol/L–100 µmol/L	非適用
ラット摘出大動脈に対するPF-07321332 の影響の評価	[redacted]LJ076	0.000002 µmol/L–100 µmol/L	非適用
神経機能 – ラット [a]			
FOB 体温 自発運動	8455743 ([redacted]GR274)	0, 0 (150 MTBE)[b], 60, 1000 mg/kg	適用
肺機能 – ラット [a]			
一回換気量，呼吸数および分時換気量	8455743 ([redacted]GR274)	0, 0 (150 MTBE)[b], 60, 1000 mg/kg	適用
心血管 – 無麻酔サル [c]			
血圧，心拍数，心電図および左室パラメータ	[redacted]GR275	0, 0[22.5 (11.25 BID) MTBE][b], 40 (20 BID), 150 (75 BID) mg/kg	適用

GLP 適用試験はデータ相互受け入れ制度に参加する OECD 加盟国で実施した。
a. 単回投与
b. 対照群の MTBE 量は，高用量群の MTBE 量（15% MTBE）に基づいた。これは，8455743 試験では 150 mg/kg の MTBE，[redacted]GR275 試験では 22.5（11.25 BID）mg/kg/日の MTBE に相当した。
c. 約 6 時間間隔で 1 日 2 回投与した。

神経系への影響を評価するため，雄ラットに溶媒または 60 もしくは 1000 mg/kg のニルマトレルビルを単回経口投与し，ラットの神経機能（投与 1 時間後に実施した FOB およびその後に実施した 60 分間の自発運動量の定量的評価を含む）を評価した（[redacted]GR274 試験）。FOB パラメータへの影響は，1000 mg/kg の用量まで認められなかった。自発運動量の定量的評価では，ニルマトレルビルの 1000 mg/kg 群で，溶媒対照群と比較して，評価期間の最初の 5 分間に垂直運動の平均回数の減少（-36%），評価期間の最後の 30 分間に水平運動（+298%）および垂直運動（+838%）の平均回数の増加が認められた。ラットを用いた 14 日間投与毒性試験（[redacted]GR276 試験）の試験 1 日における雄の総 C_{max} に基づくと，1000 mg/kg および 60 mg/kg（NOEL）を投与したときの曝露量は，ヒトにニルマトレルビル/リトナビルの治療用量（300/100 mg BID）を投与したときのニルマトレルビルの総 C_{max} のそれぞれ 23 倍および 3.5 倍であった。

呼吸系への影響を評価するため，雄ラットに溶媒または 60 mg/kg もしくは 1000 mg/kg のニルマトレルビルを単回経口投与し，その後 6 時間，連続的にモニタリングした。この結果，ニルマトレルビルの 1000 mg/kg 群で，投与後 40 分から 160 分の間に溶媒対照群と比較して呼吸数（最大で+44%）および分時換気量（最大で+38%）が増加した（[redacted]GR274 試験）。ラットを用いた 14 日間投与毒性試験（[redacted]GR276 試験）の試験 1 日における雄の総 C_{max} に基づくと，1000 mg/kg

および 60 mg/kg（NOEL）を投与したときの曝露量は，ヒトに治療用量を投与したときのニルマトレルビルの総 C_{max} のそれぞれ 23 倍および 3.5 倍であった。

心血管系への影響を評価するため，一連の in vitro，ex vivo および in vivo 試験を実施した。hERG 阻害試験（[redacted]LJ022 試験）では，ニルマトレルビルを 300 µmol/L の濃度で適用したとき，溶媒対照群と比較してわずかではあるが統計的に有意（$p < 0.05$）な hERG 阻害が認められたが，30 µmol/L を適用したときの hERG 阻害は統計的に有意ではなかった。hERG カリウム電流に対するニルマトレルビルの阻害作用の IC_{50} 値は算出しなかったが，300 µmol/L（ヒトに治療用量を投与したときのニルマトレルビルの非結合型 C_{max} の 153 倍）を上回ると推定された。モルモットから摘出したランゲンドルフ灌流心モデル（[redacted]LJ075 試験）では，ニルマトレルビルは，検討したいずれの濃度［最高 100 µmol/L（ヒトに治療用量を投与したときの非結合型 C_{max} の 51 倍）］においても心機能（+dP/dT，左室圧および冠動脈潅流圧）または心伝導（PR，QRS および QT 間隔）に統計的に有意な変化を及ぼさなかった。ラットから摘出した大動脈組織の標本（[redacted]LJ076 試験）についてティッシュバスを用いた評価では，ニルマトレルビルにより，対照と比較して統計的に有意かつ濃度依存的な血管収縮抑制が認められた。IC_{50} 値は 50.3 µmol/L であり，この濃度は，ヒトにニルマトレルビル/リトナビルの治療用量（300/100 mg BID）を投与したときのニルマトレルビルの非結合型 C_{max} の 26 倍であった。

心血管系安全性薬理試験として，独立した GLP 適用試験も実施した。この試験では，テレメトリーを装着した雄の無麻酔サルにニルマトレルビルを 0（溶媒），40（20 BID）または 150（75 BID）mg/kg/日の用量でクロスオーバーデザインにより投与し，初回投与後約 24 時間にわたって各動物から心血管データを得た。ニルマトレルビルを 40（20 BID）mg/kg/日の用量で経口投与したとき，測定したいずれのパラメータにも変化は認められなかった。ニルマトレルビルを 150（75 BID）mg/kg/日の用量で投与したときには，心拍数の最大-14 bpm の減少が初回投与後 0.75～16.00 時間に認められ，収縮期，拡張期および平均血圧の上昇（最大+5 mmHg）が初回投与後 0.75～5.5 時間（拡張期血圧のみ）および初回投与後 7.25～9.00 時間に認められた。初回投与後 0.75～16.00 時間に RR 間隔の延長（最大で+52 msec）が認められ，同時点で心拍数減少がみられたことと一致していた。初回投与後 0.75～9.00 時間に PR 間隔（+3 msec）および QT 間隔（最大+13 msec）の延長が認められ，これは，心拍数の減少に伴う二次的な変化と考えられた。QTc 間隔には，初回投与後 7.25～16.00 時間に短縮（最大-7 msec）が認められた。ニルマトレルビルを 150（75 BID）mg/kg/日の用量で投与したとき，初回投与後 0.75～9.00 時間に LV +dP/dt max も低下（最大-364 mmHg/sec）した。すべての測定値は，初回投与後 24 時間以内に溶媒対照を投与したときのレベルに回復した（[redacted]GR275 試験）。この試験で得られた PK データおよびサルを用いた 15 日間投与毒性試験の試験 1 日における雄のデータ（[redacted]GR289 試験）に基づくと，150 mg/kg および 40 mg/kg（NOEL）を投与したときの曝露量は，ヒトにニルマトレルビル/リトナビルの治療用量（300/100 mg BID）を投与したときのニルマトレルビルの総 C_{max} のそれぞれ 4.7 倍および 0.54 倍であった。

2.5. 薬力学的薬物相互作用

In vitro でのリトナビルとの併用試験は 2.4.2.2.1.3 項に示す。In vivo でのリトナビルとの併用試験は 2.4.2.2.2.2 項に示す。

3. 薬物動態試験

3.1. 要約

非臨床動物種およびヒトにおけるニルマトレルビルの薬物動態プロファイルを評価した。

吸収

- ラットおよびサルにおいて，単回経口投与後のニルマトレルビルの吸収は速く，経口バイオアベイラビリティはラットで中程度，サルでは低かった。
- ラットおよびサルを用いた反復投与毒性試験において，ニルマトレルビルの曝露量（C_{max} および AUC_{24}）は用量の増加に伴って増加し，一貫した性差は認められなかった。
- ウサギを用いた生殖発生毒性試験において，ニルマトレルビルの曝露量（C_{max} および AUC_{24}）は用量の増加に伴って増加した。
- ニルマトレルビルの受動的膜透過性は低く，P-gp の基質となることが示された。

分布

- ニルマトレルビルの血漿タンパク結合率は検討した各動物種で中程度であった。ウサギ血漿でのタンパク結合率が濃度に依存したが，ラット，サルおよびヒト血漿では濃度依存的なタンパク結合率の変化はみられなかった。予備的データから，ニルマトレルビルは主にα1-酸性糖タンパク質に結合することが示されている。
- ラットにおいて，[^{14}C]ニルマトレルビルは広範な組織に分布したが，大多数の組織での AUC_t の組織：血漿比は 1 未満であった。高い組織内 C_{max} が認められた組織は肝臓，腎臓，膵臓，副腎およびハーダー腺であった。[^{14}C]ニルマトレルビル由来の放射能は血液脳関門を通過しなかった。

代謝

- ヒト肝ミクロソームにおけるニルマトレルビルの酸化的代謝に寄与する主要な酵素は CYP3A4 であった（$f_m = 0.99$）。
- ニルマトレルビルの代謝的クリアランスには CYP3A が主に関与することから，臨床ではニルマトレルビルの血漿中濃度を上昇させる目的でリトナビル（CYP3A 阻害剤）が併用される。
- ヒトにニルマトレルビルをリトナビルとの併用で単回経口投与したときの血中の主な成分は未変化体ニルマトレルビルであり，酸化的あるいは加水分解代謝物はわずかであった。

排泄

- ラットおよびサルにおいて，ニルマトレルビルの尿中，胆汁中または糞中への排泄は少量であった（20%未満）。ヒトにニルマトレルビル/リトナビルを投与したとき，ニルマトレルビルは主に未変化体として尿中および糞中に排泄された。

- 定量的 ^{19}F NMR 法および LC-MS/MS 法で測定したマスバランス試験の結果，ヒトにニルマトレルビル/リトナビルを投与したとき，ニルマトレルビル関連物質の 85%が回収された。

薬物代謝酵素との相互作用

- In vitro で，ニルマトレルビルは CYP3A 以外の主要なヒト P450 分子種に対して可逆的あるいは時間依存的阻害を示さなかった。ニルマトレルビルは CYP2B6，2C8，2C9 および 3A4 を誘導する可能性が示されたが，静的モデルを用いた評価の結果，これらの酵素誘導に関する臨床での薬物相互作用のリスクは低いと考えられた。

- 臨床薬物相互作用試験でミダゾラム（CYP3A4 基質）をニルマトレルビル/リトナビルと併用したところ，ミダゾラムの AUC_{inf} および C_{max} は上昇したが，ニルマトレルビル/リトナビルはリトナビル単独によるものを超える薬物相互作用はもたらさないことが示された。

- In vitro で，ニルマトレルビルは主要なヒト UGT を阻害しなかった。

トランスポーターとの相互作用

- In vitro で，ニルマトレルビルはヒト BCRP，MATE1，MATE2K，NTCP，OAT1，OAT2，OAT3，OCT1，OCT2，PEPT1，OATP1B1，OATP1B3，OATP2B1 または OATP4C1 に対して基質性を示さなかった。

- ニルマトレルビルは P-gp および OATP1B1 を阻害する可能性が示されたが，静的モデルを用いてさらに評価したところ，これらのトランスポーターを介した臨床での薬物相互作用のリスクは低いと考えられた。

- 臨床薬物相互作用試験でダビガトラン（P-gp 基質）をニルマトレルビル/リトナビルと併用したところ，ダビガトランの AUC_{inf} および C_{max} は上昇したが，ニルマトレルビル/リトナビルはリトナビル単独によるものを超える薬物相互作用はもたらさないことが示された。

3.2. 分析法

薬物動態試験における血漿中ニルマトレルビル濃度の測定には LC-MS/MS 法を用いた。GLP 適用毒性試験での血漿中ニルマトレルビル濃度を定量するために用いる測定法をバリデートした（Table 3）。

Table 3.　ニルマトレルビルの LC-MS/MS 法バリデーション

測定対象	定量範囲	試験番号
Wistar Han ラット血漿	10～50000 ng/mL	PF-07321332_[redacted]_014313
Wistar Han ラット血漿	10～50000 ng/mL	[redacted]
New Zealand White ウサギ血漿	10～50000 ng/mL	
カニクイザル血漿	10～50000 ng/mL	PF-07321332_[redacted]_015142
カニクイザル血漿	10～50000 ng/mL	[redacted]

3.3. 吸収

3.3.1. In vitro での吸収

Caco-2 細胞における A-B P_{app} は評価した濃度範囲（0.03～81 µmol/L）で 0.66～1.2×10^{-6} cm/sec であり，MDCK 低排出細胞株で認められた低い受動的膜透過性と一致する[13]。排出トランスポーター阻害剤のカクテルで前処理した Caco-2 細胞では A-B P_{app} が増加し，能動輸送されることが示された（PF-07321332_[redacted]_095737 試験）。また，ニルマトレルビルは P-gp の基質となることが示された（PF-07321332_[redacted]_124535 試験）。

3.3.2. 単回投与時の薬物動態

ラット（PF-07321332_[redacted]_103131 試験）およびサル（PF-07321332_[redacted]_111728 試験）にニルマトレルビルを単回投与したときの吸収は速やかであった。無水結晶型と比べ，MTBE 溶媒和物として投与したときの方が高い経口バイオアベイラビリティを示した（Table 4）。

Table 4.　ラットおよびサルにおけるニルマトレルビルの薬物動態パラメータ

動物種	投与量[a] (mg/kg)	投与経路	N	CL (mL/min/kg)	V_{ss} (L/kg)	$t_{½}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{inf} (ng•h/mL)	AUC_{last} (ng•h/mL)	%F
ラット	1	IV	2	27.2	1.8	5.1	–	–	632	630	–
	10	PO	2	–	–	4.0	1.5	1290	3190	3170	50
	10[b]	PO	3	–	–	2.8	0.25	1450	2170	2160	34
	100	PO	2	–	–	14[c]	0.75	29100	58600[c]	68500	>100
	100[b]	PO	3	–	–	5.7	1.4	5300	18100	18000	29
	300	PO	2	–	–	NR[d]	0.38	48900	153000	153000	81
	1000	PO	2	–	–	8.7	1.0	88300	750000	749000	>100
サル	1	IV	2	17.1	0.33	0.8	–	–	977	976	–
	10	PO	2	–	–	NR[d]	0.25	1450	NR[e]	831	8.5

a. 特記しない限り，ニルマトレルビル（MTBE との溶媒和物）を被験物質として投与した。
b. ニルマトレルビル（無水結晶型）を被験物質として投与した。
c. N = 1
d. 識別可能な消失相が得られなかったため，パラメータは算出しなかった。
e. 最後の測定時点で濃度が上昇したため，パラメータは算出しなかった。

3.3.3. 反復投与時の薬物動態（トキシコキネティクス）

ラット，ウサギおよびサルを用いた一部の GLP 適用経口投与毒性試験で TK を評価した。

- これらの動物種において，ニルマトレルビルの曝露量（C_{max} および AUC_{24}）は用量の増加に伴って増加した。
- ニルマトレルビルの曝露量に一貫した性差は認められなかった。ラットでは投与 1 日に比べ，投与 14 または 25 日において AUC_{24} の減少が認められた。サルでは AUC_{24} の減少は主に投与 15 日に中用量の雌でみられた。

3.4. 分布

3.4.1. In vitro での血漿タンパク結合率

ラット，サルおよびヒトにおけるニルマトレルビルの血漿タンパク結合率は中程度で，評価したすべての動物種において同程度であり，濃度依存性はみられなかった。ウサギ血漿ではタンパク結合率に濃度依存性が認められた（Table 5，PF-07321332_[redacted]_010657 試験，[redacted]/067/394 試験）。

Table 5.　ニルマトレルビルの血漿タンパク結合率

	血漿 f_u					
動物種（系統）	**0.3 µmol/L[a]**	**1 µmol/L[a]**	**3 µmol/L[a]**	**10 µmol/L[a]**	**平均値[b]**	
ラット（Wistar Han）	0.490	0.474	0.484	0.467	0.479	
サル（カニクイザル）	0.386	0.404	0.449	0.499	0.435	
ヒト	0.296	0.300	0.311	0.333	0.310	
	血漿 f_u[a]					
	2 µmol/L	**10 µmol/L**	**30 µmol/L**	**50 µmol/L**	**100 µmol/L**	**200 µmol/L**
ウサギ（New Zealand White）	0.0100	0.449	0.734	0.737	0.817	0.804

a. 幾何平均値（n = 12）
b. 試験した 4 濃度の平均値

3.4.2. In vitro での血液／血漿中濃度比（Cb/Cp）

ニルマトレルビルは 1 µmol/L の濃度では赤血球と比較して血漿中に多く分布し，Cb/Cp は 0.83（ラット），0.68（サル）および 0.60（ヒト）であった（PF-07321332_[redacted]_100444 試験）。

3.4.3. ラットにおける組織分布

[^{14}C]ニルマトレルビルを単回経口投与後の放射能は 0.5 時間以内に広範に分布した。肝臓，腸および腎臓を除いた大部分の組織で AUC_t の組織：血漿比は 1 未満であった。[^{14}C]ニルマトレルビル由来の放射能は血液脳関門を通過せず，これはニルマトレルビルが P-gp の基質であり，ペプチド模倣構造を持つことと一致した。

多くの組織で[^{14}C]ニルマトレルビル由来の放射能は 24 時間以内に消失した。[^{14}C]ニルマトレルビルのメラニン含有組織への結合は認められなかった（8476949 試験）。

3.5. 代謝

ニルマトレルビルの代謝は，in vitro インキュベーションおよび in vivo 血漿検体より定性的に評価した。

In vitro（マウス，ラット，ハムスター，ウサギ，サルおよびヒト肝ミクロソームまたは肝細胞）および in vivo（ラットおよびサル血漿）におけるニルマトレルビルの代謝プロファイルは同様の酸化的代謝を示した。主要な酸化代謝物は，ピロリジノン環のヒドロキシル化により生成された M4（PF-07329268）であった（PF-07321332_[redacted]_084546 試験）。

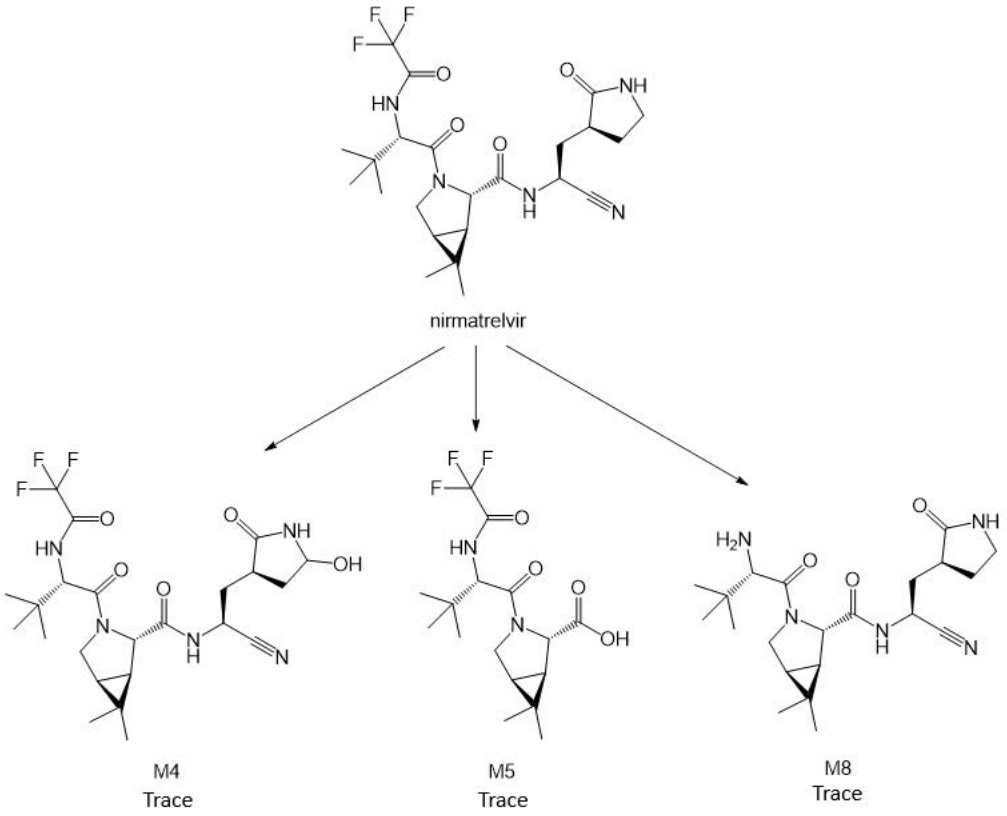
酸化的代謝による生体内変換のほかに，ニルマトレルビル内のアミド結合の加水分解により生成された代謝物 M5（PF-07320267）も動物の循環血中および排泄物中に微量ながら検出された。ニルマトレルビルをヒトの腸内細菌叢とインキュベートしたところ，M5（PF-07320267）と並んで脱トリフルオロアセチル代謝物 M8（PF-07331782）も検出された（PF-07321332_[redacted]_082057 試験）。ヒト全血，腸液ならびに肝臓，腎臓，腸および肺から得られた S9 を含むヒト由来試料を用いた in vitro 評価系において，加水分解は認められなかった。

ヒト肝ミクロソームにおけるニルマトレルビルの酸化的代謝に寄与する主要な酵素は CYP3A4 であった（$f_m = 0.99$）（PF-07321332_[redacted]_072016 試験）。ニルマトレルビルの代謝的クリアランスには CYP3A が主に関与することから，臨床ではニルマトレルビルの血漿中濃度を上昇させる目的でリトナビル（CYP3A 阻害剤）が併用される。リトナビルとの併用により，ニルマトレルビルの全体の消失における酸化的代謝の寄与は小さくなった。

健康被験者にリトナビル（100 mg）との併用でニルマトレルビル（300 mg）を単回投与した際（C4671001 試験，コホート 9），血漿中で主に検出された薬物関連物質はニルマトレルビルの未変化体で，M4，M5 および M8 は微量であった（PF-07321332_[redacted]_090141 試験，Figure 2）。血中にヒト特有の代謝物は認められなかった。

ヒト肝ミクロソームを用いた in vitro 試験で M5 のグルクロン酸抱合に関与する UGT 酵素を同定した。M5 の代謝に UGT2B4 および 2B7 がそれぞれ 69.8%および 16.7%寄与していた。残りの 13.5%については，どの UGT 代謝酵素によるものか判断できなかった（PF-07321332_[redacted]_021055 試験）。

Figure 2. **ヒトにニルマトレルビル 300 mg をリトナビルと併用経口投与した際のニルマトレルビルの血中代謝プロファイル**



3.6. 排泄

ニルマトレルビルの排泄を，ラット，サルおよびヒトの排泄物検体を用いて評価した。

ラットおよびサルにおいて，ニルマトレルビル静脈内投与後の尿中，胆汁中または糞中への未変化体の排泄は少量であった（20%未満）（PF-07321332_[redacted]_103131 試験，PF-07321332_[redacted]_111728 試験）。

健康被験者 6 人（C4671001 試験，コホート 9）にニルマトレルビル/リトナビル（300/100 mg）を単回投与し，非標識ニルマトレルビルのマスバランス，排泄経路および代謝プロファイルを評価した（PF-07321332_[redacted]_014401 試験，PF-07321332_[redacted]_021626 試験）。尿中および糞便中の回収率測定には以下の 2 種の測定法を用いた。すなわち，LC-MS/MS 法でニルマトレルビルおよび加水分解代謝物 M5（PF-07320267）を定量し，^{19}F NMR 法でフッ素を含有するすべてのニルマトレルビル関連物質を定量した。

マスバランスを評価した結果，LC-MS/MS 法で 75.6%，^{19}F NMR 法で 80.7%が回収された。2 種の測定法を用いた尿中および糞便中排泄率はそれぞれ 41～47%および 34～35%と同様であったことから，排泄物中に含まれるニルマトレルビル関連化合物の大部分がニルマトレルビルおよび代謝物 M5（PF-07320267）であることが示唆された。さらに，投与量の 4.2%がフッ素非含有化合物で ^{19}F NMR に反応しない代謝物 M8（PF-07331782）として排泄され，この代謝物につい

ては LC-MS/MS 法により尿中および糞中濃度を定量した。その結果，^{19}F NMR データおよび M8 を合計すると，投与量の 85%が回収された。

リトナビルとの併用で経口投与されたニルマトレルビルの主な排泄ルートは未変化体の尿中排泄および M5 への加水分解を含む代謝によるものであった（PF-07321332_[redacted]_021626 試験）。

3.7. 薬物動態学的薬物相互作用

ニルマトレルビルによる in vitro での主要な P450 分子種および UGT 分子種の阻害，主要な P450 分子種の誘導ならびに種々の排出，肝取込みおよび腎排泄トランスポーターの阻害を検討した。ニルマトレルビルが相互作用薬として薬物相互作用を引き起こすリスクは，薬物相互作用に関する厚生労働省ガイドライン[14]，米国食品医薬品局ガイダンス[15]および欧州医薬品庁ガイドライン[16]に従って評価した。

薬物相互作用のリスクは，成人 COVID-19 患者にニルマトレルビル/リトナビルを 300/100 mg BID で 5 日間投与したときのシミュレーションに基づく投与 5 日における非結合型 C_{max} 1.96 µmol/L（0.98 µg/mL）（2.7.2.4.3.2 項）に基づいて評価した。腸管内薬物濃度（I_{gut}）は 2.4 mmol/L（1.2 mg/mL；300 mg / 250 mL より）と推定した。また肝臓入り口の血液中での推定最大非結合型薬物濃度（$I_{in,max,u}$）は，消化管アベイラビリティ（F_aF_g）0.712，吸収速度定数（k_a）0.873 hr^{-1} および肝血流量（Q_h）1620 mL/min に基づき，3.95 µmol/L とした。

静的ベーシックモデルに基づく評価により，ニルマトレルビルは CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9 および CYP3A4 を誘導，CYP3A4 を可逆的および時間依存的に阻害ならびに P-gp および OATP1B1 を阻害する可能性があることが示された。

さらに，静的モデルを用いて，推定 C_{max} に基づいた可逆的阻害ならびに血漿，腸管腔，腸細胞，肝臓および門脈流入部の C_{av}（$k_{p,uu}$ および k_a を含む）に基づいた時間依存的阻害を評価し，ニルマトレルビルが薬物相互作用を引き起こす可能性をより詳細に検討した。このモデルに基づくと，ニルマトレルビルが CYP3A4 以外のヒト主要 P450 分子種，UGT 分子種およびトランスポータータンパク質を阻害するリスクは低いと考えられたものの，ヒトに治療用量を投与したときに CYP3A4 の可逆的および時間依存的な阻害が生じる可能性が残った。しかしながら，ニルマトレルビル/リトナビルにミダゾラム（CYP3A4 基質）またはダビガトラン（P-gp 基質）を併用する臨床薬物相互作用試験を実施した結果，リトナビル単独によるものを超える薬物相互作用は認められなかった。

3.7.1. P450 に対する阻害能

ヒト肝ミクロソームを用いた試験で，ニルマトレルビルは CYP3A4/5 を可逆的に阻害することが示され，IC_{50} 値はそれぞれ 58.3 µmol/L（ミダゾラム），106 µmol/L（テストステロン）および 45.1 µmol/L（ニフェジピン）であった（PF-07321332_[redacted]_113907 試験，概要表 2.6.5.12A）。ニルマトレルビルは CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19 および CYP2D6 を可逆的に阻害しなかった（IC_{50} 値は 300 µmol/L 超）。

加えて，ニルマトレルビルは，ミダゾラムをプローブ基質として用いたときには 3.16 µmol/L 以上の濃度で，テストステロンをプローブ基質として用いたときには 0.562 µmol/L 以上の濃度

で，CYP3A4/5 を時間依存的に阻害することが示された（PF-07321332_[redacted]_122202 試験，概要表 2.6.5.12B）。このときのニルマトレルビルの K_I 値および k_{inact} 値は，テストステロン 6β-水酸化に対してそれぞれ 13.9 µmol/L および 0.0165 min^{-1}，ミダゾラム 1'-水酸化に対しては 15.5 µmol/L および 0.0142 min^{-1} であった。したがって，予定治療用量において，CYP3A4/5 の可逆的阻害および時間依存的阻害により薬物動態学的薬物相互作用が生じるリスクがあると考えられた。

3.7.2. P450 および UGT を介した相互作用

ヒト肝ミクロソームおよびヒト肝細胞を用いて，ニルマトレルビルによる主要な P450 分子種および UGT 分子種の阻害，ならびに主要な P450 分子種の誘導について検討した（Table 6）。

ニルマトレルビルは CYP3A4/5 以外の主要な P450 分子種に対して可逆的阻害を示さなかった。CYP3A4 に対しては時間依存的阻害も認められた。

C4671013 臨床試験でニルマトレルビル/リトナビルにミダゾラム（CYP3A4 基質）を併用したところ，ミダゾラムの AUC_{inf} および C_{max} はそれぞれ 14 倍および 3.7 倍上昇した。一方，リトナビルのみを併用したときのミダゾラムの AUC_{inf} および C_{max} 上昇はそれぞれ 16 倍および 3.9 倍であったことから，ニルマトレルビル/リトナビルはリトナビル単独によるものを超える薬物相互作用はもたらさないことが示された（2.7.2.2.2.4.2 項）。

ニルマトレルビルは CYP3A4，2B6，2C8 および 2C9 を誘導する可能性が示されたが，静的モデルを用いた評価の結果，臨床濃度でこれらの酵素を誘導するリスクは低いものと考えられた。

ヒト肝ミクロソームにおいて，ニルマトレルビルは検討した UGT 分子種に対して可逆的阻害を示さなかった。

Table 6.　P450 および UGT に関する薬物相互作用試験の要約

試験	適用濃度（μmol/L）	結果	試験番号
P450：可逆的阻害	0.01～300	IC_{50} 値 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6：>300 μmol/L 3A4/5：45 - 106 μmol/L	PF-07321332_[redacted]_113907
CYP3A4/5：時間依存的阻害	0.1～100	ミダゾラム： k_{inact} / K_I = 0.916 mL•min^{-1}•μmol^{-1} テストステロン： k_{inact} / K_I = 1.23 mL•min^{-1}•μmol^{-1}	PF-07321332_[redacted]_122202
P450：誘導	0.01～200	mRNA を 2 倍以上誘導： 3A4 (≥1 μmol/L), 2B6 (≥30 μmol/L), 2C8 (≥10 μmol/L), 2C9 (≥30 μmol/L) 誘導なし：1A2, 2C19	PF-07321332_[redacted]_102559
UGT：可逆的阻害	1～100	IC_{50} 値 1A1, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7, 2B15：>100 μmol/L	PF-07321332_[redacted]_103243

K_I：最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害剤の濃度，K_{inact}：最大不活性化速度定数

3.7.3. トランスポーターを介した相互作用

3.7.3.1. トランスポーターの基質となる可能性

種々のトランスポーターについて，ニルマトレルビルが基質となる可能性を検討した（Table 7）。

Table 7.　トランスポーター基質性試験の要約

試験番号	適用濃度（μmol/L）	結果
PF-07321332_[redacted]_114514	0.385～7.7	NTCP ならびに OATP 1B1, 1B3, 2B1 の基質とならなかった
PF-07321332_[redacted]_110227	0.5	OAT2, NTCP, OATP の取込みによる輸送を受けなかった。胆汁中排泄が認められた
PF-07321332_[redacted]_124535	0.3～3	BCRP の基質にはならないが，P-gp の基質となることが示された
PF-07321332_[redacted]_013448	0.5～10 または 20	MATE1, MATE2K, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, PEPT1 の基質とならなかった
PF-07321332_[redacted]_124557	1	OATP4C1 の基質とならなかった

3.7.3.2. トランスポーターに対する阻害能

安定的にトランスフェクトされた HEK293 細胞または小胞系を用いて検討した結果，種々の排出トランスポーターおよび取込みトランスポーターの大部分に対し，ニルマトレルビルが阻害する可能性は低いことが示された（PF-07321332_[redacted]_020944 試験）。ベーシックモデルでは，治療用量においてニルマトレルビルの P-gp および OATP1B1 の阻害による薬物相互作用の可能性が示された（Table 8）。しかし，静的モデルを用いた評価ではこれらのトランスポーター阻害のリスクは低いことが示されている。

C4671012 臨床試験でニルマトレルビル/リトナビルにダビガトラン（P-gp 基質）を併用したところ，ダビガトランの AUC_{inf} および C_{max} はそれぞれ 1.9 倍および 2.3 倍上昇した。一方，リトナビルのみを併用したときのダビガトランの AUC_{inf} および C_{max} 上昇はいずれも 1.7 倍であったことから，ニルマトレルビル/リトナビルはリトナビル単独によるものを超える薬物相互作用はもたらさないことが示された（2.7.2.3.1.1 項）。

Table 8.　各種トランスポーターに対するニルマトレルビルの in vitro での特性

トランスポーター	試験系	プローブ基質	ニルマトレルビル IC_{50}[a] (µmol/L)
BCRP	HEK293 小胞	0.2 µmol/L ロスバスタチン	>1000
MATE1	HEK293 細胞	15 µmol/L [^{14}C]メトホルミン	112
MATE2K	HEK293 細胞	15 µmol/L [^{14}C]メトホルミン	872
p-gp	HEK293 小胞	0.2 µmol/L N-メチルキニジン	70.6
OAT1	HEK293 細胞	0.5 µmol/L [^{3}H]パラアミノ馬尿酸	>1000
OAT3	HEK293 細胞	0.1 µmol/L [^{3}H]エストロン-3-硫酸	521
OATP1B1	HEK293 細胞	0.3 µmol/L ロスバスタチン	44.4
OATP1B3	HEK293 細胞	0.3 µmol/L ロスバスタチン	283
OCT1	HEK293 細胞	10 µmol/L [^{14}C]メトホルミン	138
OCT2	HEK293 細胞	15 µmol/L [^{14}C]メトホルミン	955

a. すべてのトランスポーター阻害アッセイで推定 K_i 値は IC_{50} 値と等しいと仮定した。ただし，P-gp については換算係数 1.28 を用いた（$K_i = IC_{50}/1.28$）。

4. 毒性試験

4.1. 要約

ニルマトレルビルについて Table 9 および概要表 2.6.7.1 に示す一連の非臨床安全性試験で評価した。

薬物動態試験の結果から，ラット，サルおよびヒトの間でニルマトレルビルの代謝および血漿タンパク結合に類似性が認められたことから，毒性試験に用いる動物種としてラットおよびサルを選択した。なお，ニルマトレルビルの標的はウイルス特異的タンパク質であること，および副次的薬理試験の結果に基づくとニルマトレルビルがオフターゲット作用を示す可能性は低いことから，薬理学的な観点で毒性試験に適切な動物種は存在しないと考えられる。In vivo 試験での投与経路には，臨床投与経路である経口投与を選択した。

Table 9.　毒性試験の概要

試験 [a,b]	試験番号（ファイザー社試験番号）	濃度または用量 [c]	GLP	概要表
反復投与毒性試験				
重要な試験以外の試験				
ラットを用いた 4 日間投与試験	[redacted]GR250	0, 30, 100, 1000	非適用	2.6.7.6
カニクイザルを用いた 4 日間投与試験	[redacted]GR271	0, 30 (15 BID), 300 (150 BID), 1000 (500 BID)[d]	非適用	2.6.7.6
重要な試験				
ラットを用いた 2 週間投与試験	[redacted]GR276	0, 0 (150 MTBE)[e], 60, 200, 1000	適用	2.6.7.7A
ラットを用いた 1 ヵ月間投与試験	[redacted]GR122	0, 60, 200, 1000	適用	2.6.7.7B
カニクイザルを用いた 15 日間投与試験	[redacted]GR289	0, 0 [90 (45 BID) MTBE][e], 40 (20 BID), 100 (50 BID), 600 (300 BID)[d]	適用	2.6.7.7C
カニクイザルを用いた 1 ヵ月間投与試験	[redacted]GR125	0, 40 (20 BID), 100 (50 BID), 600 (300 BID)[d]	適用	2.6.7.7D
遺伝毒性試験				
In vitro 試験				
細菌を用いる復帰突然変異試験	[redacted] ([redacted]GR288)	1.50–5000 µg/plate	適用	2.6.7.8A
ヒト培養リンパ芽球様 TK6 細胞を用いた小核誘導試験	[redacted] ([redacted]GR286)	62.5–500 µg/mL	適用	2.6.7.8B
In vivo 試験				
ラットを用いた in vivo 小核試験 [f]	[redacted]GR276[f]	0, 0 (150 MTBE)[e], 60, 200, 1000	適用	2.6.7.9B
生殖発生毒性試験				
ラットを用いた受胎能に関する試験	[redacted]GR146	0, 60, 200, 1000	適用	2.6.7.12
ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験	[redacted]GR132	0, 100, 300, 1000	適用	2.6.7.13 A
ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験	[redacted]GR126	0, 100, 300, 1000	適用	2.6.7.13 B
ラットを用いた発生前および発生後の発生ならびに母体の機能に関する試験	00655272 ([redacted]GR149)	0, 100, 300, 1000	適用	2.6.7.14
その他の毒性試験				
ラットを用いた不純物の 2 週間経口投与毒性試験	[redacted]GR206	0 (30 MTBE), 200[e]	適用	2.6.7.17

a. すべての GLP 適用試験はデータ相互受け入れ制度に参加する OECD 加盟国で実施した。
b. すべての in vivo 試験で雌雄を用いた（ただし，胚・胎児試験では雌動物のみ使用）。
c. 特記しない限り，すべての用量を mg/kg で表す。
d. 1 日 2 回投与の間隔は約 6 時間である。
e. 対照群の MTBE 量は高用量群の MTBE 量（15% MTBE）に基づいた。これは，[redacted]GR276 試験では 150 mg/kg/日，[redacted]GR289 試験では 90（45 BID） mg/kg/日，[redacted]GR206 試験では 30 mg/kg/日の MTBE に相当した。
f. ラットを用いた 2 週間投与試験（[redacted]GR276 試験）の一環として実施した。

ニルマトレルビルの一般毒性は，ラットおよびカニクイザルを用いた 1 ヵ月間までの GLP 適用反復投与毒性試験 4 試験で評価した。いずれの試験においても毒性学的に意義のある変化はみられず，各試験の NOAEL は最高用量で，1 ヵ月間試験での NOAEL におけるヒトにニルマトレルビル/リトナビルを 300/100 mg で投与した際の総濃度に対する曝露比（C_{max} および AUC_{24}）はラットで 14 倍および 10 倍，サルで 28 倍および 18 倍であった。ニルマトレルビル投与に関連する変化として，ラット 1 ヵ月間投与毒性試験で散発的な流涎および軟便，サルで散発的な嘔吐およびそれに伴う軽微な体重減少がみられたものの，毒性学的意義の乏しい変化であった。ラットの臨床病理検査において，軽度の炎症または血液凝固系経路に関連した変化がみられたが，関連する一般状態の変化または病理組織学的所見は認められず，回復性も認められたことから毒性学的意義は乏しく，臨床においてモニタリング可能な変化と考えられた。サルでは 1 ヵ月間投与毒性試験の最高用量で ALT，AST およびフィブリノゲンの増加がみられたが，概して回復性があり，関連する一般状態の変化または病理組織学的所見はみられなかったことから毒性学的意義は乏しく，臨床においてモニタリング可能な変化と考えられた。ラット 2 週間および 1 ヵ月間投与毒性試験の両試験において，対照群と比較して肝臓重量の増加がみられた。肝臓重量の増加は，軽微から軽度の肝臓（門脈周囲の肝細胞の肥大および空胞化），甲状腺（濾胞細胞の肥大）および下垂体（1 ヵ月間投与毒性試験の雄で前葉内分泌細胞の細胞質空胞化）の変化を伴っていたものの，概ね回復性が認められ，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。これらの変化は肝酵素誘導に対するラット特異的な反応と一致しており，その結果，サイロキシンの異性化亢進，血清中甲状腺刺激ホルモンの増加ならびに甲状腺の濾胞細胞の肥大および下垂体前葉における前葉内分泌細胞の空胞化が生じることが報告されている[17,18,19]。この作用メカニズムは，げっ歯類とヒトとで甲状腺ホルモンの血漿中半減期および輸送タンパク質への結合に著しい種差があるため，通常ヒトに対してはほとんどまたは全く関連しないと考えられている[19]。

ニルマトレルビルは一連の生殖発生毒性試験，すなわちラットを用いた受胎能に関する試験，ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験ならびにラットを用いた発生前及び発生後の発生並びに母体の機能に関する試験において 1000 mg/kg/日までの用量で毒性学的意義のある影響を示さず，同用量での各試験における臨床での総濃度に対する曝露比（C_{max} および AUC_{24}）は 16 倍および 5.3 倍，21 倍および 9.8 倍，32 倍および 13 倍，ならびに 21 倍および 9.8 倍であった。ラットを用いた受胎能に関する試験および胚・胎児発生に関する試験ではニルマトレルビルは毒性学的意義のある作用を示さなかった。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では，1000 mg/kg/日で毒性変化と考えられる胎児の体重低下（対照群の 0.91 倍）が認められ，この用量では母動物に毒性学的意義の乏しい変化と考えられる体重変化および摂餌量への影響がみられたものの，胎児の形態または胚・胎児の生存率にニルマトレルビル投与に関連する影響は認められなかった。ラットを用いた発生前及び発生後の発生並びに母体の機能に関す

る試験では F_0 および F_1 世代に毒性学的意義のある影響は認められなかった。これらの結果から，ニルマトレルビルのヒトの生殖発生能に対するリスクはほとんどないと考えられた。

ニルマトレルビルは，in vitro 遺伝毒性試験で変異原性および染色体異常誘発性を示さず，ラットを用いた GLP 適用 2 週間反復投与毒性試験の一部として実施した in vivo 小核試験においても陰性であった。また，紫外線および可視光線の吸収プロファイルより，ニルマトレルビルに光毒性のリスクがないことが示された。

ラットを用いた不純物の 2 週間経口投与毒性試験において，種々の不純物（ *不純物A ，*不純物B ， *不純物C ， *不純物D ， *不純物E ， *不純物F または *不純物G ）を添加したニルマトレルビルを 200 mg/kg/日で投与したが，安全性プロファイルの変化は認められなかった。

4.2. 単回投与毒性試験

ニルマトレルビルの単回投与毒性試験は実施していない。

4.3. 反復投与毒性試験

ニルマトレルビルの探索的および重要な反復投与毒性試験はラットおよびサルを用いて実施した（概要表 2.6.7.6，2.6.7.7A，2.6.7.7B，2.6.7.7C，2.6.7.7D）。

4.3.1. ラットを用いた試験

4.3.1.1. ラットを用いた探索的 4 日間経口投与毒性試験

探索的毒性試験で雌雄の Wistar Han ラットにニルマトレルビルを 0（溶媒対照），30，100 または 1000 mg/kg/日の用量で 4 日間経口投与したところ，ニルマトレルビルの投与に関連する一般状態の変化，体重，血液学的検査および血液生化学的検査パラメータへの影響，剖検所見ならびに胸骨骨髄（評価した唯一の臓器）の病理組織学的所見は認められなかった（[redacted]GR250 試験）。

4.3.1.2. ラットを用いた 2 週間経口投与毒性試験

雌雄の Wistar Han ラットを用いて実施した GLP 適用 2 週間経口投与毒性試験では，0（溶媒対照），0（MTBE 溶媒対照），60，200 または 1000 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回投与してニルマトレルビルの毒性，TK および染色体異常誘発性・異数性誘発性を検討した。また，2 週間の休薬期間を設けて回復性を評価した（[redacted]GR276 試験，概要表 2.6.7.7A）。

本 GLP 適用試験で投与したニルマトレルビルの投与液は，1：1 の MTBE 溶媒和物であることから，本試験で認められる変化への MTBE の関与を評価するため，ニルマトレルビルの高用量群に用いた投与液と同濃度の MTBE を添加した溶媒を投与する対照群を設けた。対照群を含め，MTBE による影響が腎臓に認められたが，これらは MTBE 投与時に起こることが知られている雄ラットに特有の影響であり，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた[20,21]。

この試験では，一般状態の変化ならびに摂餌量および眼科学的検査所見への影響は認められなかった。体重への影響は雄では認められず，200 mg/kg/日以上の雌でわずかな体重増加（溶媒対照群の 1.01～1.04 倍）が認められたが，変化の程度が小さかったことから毒性学的意義の乏し

い変化と考えられた。ニルマトレルビルは，雌雄ラットの末梢血中の網状赤血球に小核を誘発しなかった。

血液凝固検査では，用量依存的な PT 延長が 60 mg/kg/日以上の雄（最大 2.50 倍）および 1000 mg/kg/日の雌（1.40 倍）で認められ，APTT の延長が 200 mg/kg/日以上の雄（最大 1.19 倍）および 1000 mg/kg/日の雌（1.11 倍）で認められた。これらの PT および APTT の延長の機序は明らかになっていない。1000 mg/kg/日で，血小板数の増加（雌雄，最大 1.25 倍），赤血球パラメータの減少（雌のみ，ヘモグロビン値が 0.95 倍）およびフィブリノゲンの上昇（雌のみ，1.10 倍）が認められた。血液生化学検査では，1000 mg/kg/日の雌雄でグロブリン上昇（1.07 倍），1000 mg/kg/日の雌でコレステロール上昇（1.33 倍），ALP 低下（0.66 倍）および A/G 比の低下（0.90 倍）がみられた。尿検査では，1000 mg/kg/日の雄で尿 pH の低下（0.90 倍）が認められた。これらの所見のいずれにおいても，関連する一般状態の変化または病理組織学的所見は認められず，休薬期間終了時にはすべての所見が完全に回復していたことから毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

投与期間終了後の剖検時に，1000 mg/kg/日の雌で心臓の絶対重量および相対重量の低値（溶媒対照群の 0.85～0.88 倍）が認められたが，関連する病理組織学的所見がみられなかったため，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。休薬期間終了時には心臓重量に対照群との差は認められなかったことから，この変化は完全に回復したことが示された。

病理組織学的検査では，肝臓の所見として，200 mg/kg/日以上の雌および 1000 mg/kg/日の雄で軽微から軽度の門脈周囲の肝細胞肥大が認められ，1000 mg/kg/日の雌では，これと同時に，門脈周囲の肝細胞空胞化の発現頻度および程度（軽微から軽度）も上昇した。肝臓におけるこれらの病理組織学的所見は，1000 mg/kg/日の雌雄でみられた肝臓重量の増加（1.35～1.59 倍）および肝腫大の剖検所見に相関して認められ，肝細胞肥大および肝細胞空胞化はミクロソーム酵素の誘導に一致する所見であった[22]。

1000 mg/kg/日では，肝臓重量の増加および肝細胞肥大に関連する所見として，甲状腺濾胞細胞の肥大（軽微から軽度）が雌雄で認められた。肝臓および甲状腺に認められた所見は，肝臓におけるミクロソーム酵素誘導による甲状腺ホルモンクリアランスの上昇に関連した二次的な適応性反応と一致する。ラットはヒトと比較して，この機序に対して特に高い感受性を示すことが知られている[18]。肝臓および甲状腺に認められた変化はすべて重篤度は低く，また，組織の損傷を示す病理組織学的所見または関連する臨床病理検査パラメータの変化を伴わなかったこと，また，いずれの所見も 2 週間の休薬期間後に完全に回復したことから毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

NOAEL は最高用量である 1000 mg/kg/日であり，この NOAEL における C_{max} および AUC_{24} は，ヒトにニルマトレルビル/リトナビル（300/100 mg BID）を投与した際のニルマトレルビルの C_{max} および AUC_{24} のそれぞれ 16 倍および 5.3 倍であった。

4.3.1.3. ラットを用いた 1 ヵ月間経口投与毒性試験

雌雄の Wistar Han ラットにニルマトレルビルを 0（溶媒対照），60，200 または 1000 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 1 ヵ月間投与して毒性および TK を評価した。また，2 週間の休薬期間を設けて回復性を評価した（[redacted]GR122 試験，概要表 2.6.7.7B）。

ニルマトレルビル投与に関連する切迫屠殺または死亡はみられず，体重および摂餌量測定ならびに眼科学的検査では変化はみられなかった。ニルマトレルビル投与に関連する一般状態の変化として，投与期間中である試験 25 日～28 日に散発的な流涎（60 mg/kg/日以上）および軟便（200 mg/kg/日の 1 例および 1000 mg/kg/日）がみられたが，臨床病理検査および病理組織学的検査でこれらの所見に関連する変化はみられなかった。

血液学的検査で 200 mg/kg/日以上の雌雄で用量依存的な血小板数の増加（対照群の 1.12～1.28 倍）が，血液凝固検査で 200 mg/kg/日の雄および 1000 mg/kg/日の雌で用量依存的な PT 延長（1.06～1.15 倍）がみられた。これらの変化は一般状態の変化および病理組織学的所見を伴わず，休薬期間終了時には回復性を示した。すべての臨床病理検査における変化は，その程度が小さく，一過性であり，一般状態の変化および病理組織学的所見を伴わなかったことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

本試験では，ニルマトレルビル投与に関連する病理組織学的所見が肝臓（雌雄），甲状腺（雌雄）および下垂体（雄のみ）に認められた。

肝臓では，200 mg/kg/日以上の雌雄で軽微から軽度の門脈周囲の肝細胞肥大がみられると共に，1000 mg/kg/日では軽度の門脈周囲の肝細胞空胞化（雌のみ）がみられ，肝臓重量の増加（60 mg/kg/日以上で 1.07～1.83 倍）ならびに 1000 mg/kg/日の雄 1 例および雌 4 例でみられた剖検所見（腫大および色調の異常）と関連していた。肝細胞肥大は肝ミクロソームの代謝酵素誘導と一致していた[22]。門脈周囲の肝細胞空胞化は，肝ミクロソーム代謝酵素の誘導後に腫大した肝臓で時折みられることから[22]，この変化は 1000 mg/kg/日の雌で肝細胞肥大から二次的に生じた変化と考えられた。

甲状腺では，60 mg/kg/日以上の雌雄で軽微から軽度の濾胞細胞の肥大がみられた。下垂体では，60 mg/kg/日以上の雄で軽微から軽度の前葉内分泌細胞の細胞質空胞化がみられ，ホルモン分泌細胞（甲状腺刺激ホルモン分泌細胞）の 1 つまたは複数の亜集団における分泌活性の増加を反映している可能性が示された。

肝臓，甲状腺および下垂体の関連付けられる一連の所見は，肝酵素誘導に対するラット特異的な反応と一致しており，その結果，サイロキシンの異性化亢進，血清中甲状腺刺激ホルモンの増加ならびに甲状腺の濾胞細胞の肥大および下垂体前葉における前葉内分泌細胞の空胞化が生じることが報告されている[17,18,19]。この作用メカニズムは，げっ歯類とヒトとで甲状腺ホルモンの血漿中半減期および輸送タンパク質への結合に著しい種差があるため，通常ヒトに対してはほとんどまたは全く関連しないと考えられている[19]。

肝臓，甲状腺および下垂体でのニルマトレルビル投与の影響は，重篤度が低く，組織損傷と関連する病理組織学的所見（壊死または炎症など）がみられず，臨床病理検査値にも関連した変化がみられないことから毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

肝臓，甲状腺および下垂体（雄）でみられた病理組織学的所見は，休薬期間終了後，雌のすべての用量および雄の 60 mg/kg/日および 200 mg/kg/日で回復した。雄の 1000 mg/kg/日では，肝臓重量の増加（1.11～1.20 倍）と関連する肝臓，甲状腺および下垂体の病理組織学的所見が回復傾向を示した。雌雄でみられた肝臓での剖検所見は，休薬期間終了後に回復した。

NOAEL は最高用量である 1000 mg/kg/日であり，この NOAEL における C_{max} および AUC_{24} は，ヒトにニルマトレルビル/リトナビル（300/100 mg BID）を投与した際のニルマトレルビルの C_{max} および AUC_{24} のそれぞれ 14 倍および 10 倍であった。

4.3.2. サルを用いた試験

4.3.2.1. サルを用いた探索的 4 日間（1 日 2 回）経口投与毒性試験

雌雄のカニクイザルを用いて実施した探索的 4 日間経口投与試験では，0（溶媒対照），30（15 BID），300（150 BID）または 1000（500 BID）mg/kg/日の用量で投与し，ニルマトレルビルの忍容性および TK を評価した（[redacted]GR271 試験，概要表 2.6.7.6）。

すべての用量で忍容性が認められ，摂餌量への影響はなかった。300 mg/kg/日以上で嘔吐が認められた。この所見の発現頻度はおおむね用量依存的であり，反復投与に伴って減少した。また，1000 mg/kg/日では体重減少も認められ，嘔吐に関連した変化である可能性が高いと考えられた。

300 mg/kg/日以上でフィブリノゲンの上昇および単球数の増加が認められ，1000 mg/kg/日では，白血球数の増加（好中球数の増加による）および網状赤血球数の減少も認められた。これらの変化は，急性期・炎症反応を示す所見であり，産生低下に起因する可能性が高い網状赤血球数の減少を伴っていた。

雌の 1000 mg/kg/日では，赤血球数増加，ヘモグロビン上昇，アルブミンおよびグロブリンの双方の上昇に起因する総タンパク質増加，尿素窒素ならびにクレアチニン上昇も認められ，いずれも血液濃縮状態・脱水状態を示す所見であった。これらの変化は，嘔吐による体液喪失に起因するものであり，この結果としてナトリウム，カリウムおよびクロールも低下した。また，ビリルビン，トリグリセリドおよびグルコースの上昇も認められた。

嘔吐に関連する一般状態および臨床病理検査値の変化が認められたことから，1000 mg/kg/日は長期投与試験での最大耐量（MTD）を上回る可能性が高いと考えられた。そのため，カニクイザルを用いた GLP 適用 15 日間反復投与毒性試験では高用量として 600 mg/kg/日を選択した。

4.3.2.2. サルを用いた 15 日間（1 日 2 回）経口投与毒性試験

雌雄のカニクイザルを用いて実施した GLP 適用 15 日間経口投与試験では，0（溶媒対照），0（MTBE 溶媒対照），40（20 BID），100（50 BID）または 600（300 BID）mg/kg/日の用量で 1 日 2 回投与し，ニルマトレルビルの毒性および TK を検討した（[redacted]GR289 試験，概要表 2.6.7.7C）。

本 GLP 適用試験で投与したニルマトレルビルの投与液は 1：1 の MTBE 溶媒和物であることから，本試験で認められる変化への MTBE の関与を評価するため，ニルマトレルビルの高用量群に用いた投与液と同濃度の MTBE を添加した溶媒を投与する対照群を設けた。本試験では，MTBE に関連した影響は認められなかった。

すべての動物が試験終了時まで生存し，ニルマトレルビル投与の摂餌量，心電図パラメータ（心拍数ならびに RR，PR，QRS，QT および QTc 間隔），心電図波形，眼科学的検査所見，臓器重量，剖検所見および病理組織学的所見への影響は認められなかった。

認められた一般状態の変化は，100 mg/kg/日以上でみられた散発的な嘔吐の発現のみであり，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。嘔吐の発現頻度はおおむね用量依存的であり，1 日 2 回投与したときの 2 回目投与後または一晩経過した後にみられた。600（300 BID）mg/kg/日の雄 1 例で体重減少（試験 1 日の 0.91 倍）が認められたが，減少の程度は小さく，一般状態の変化としてみられた嘔吐に起因するものであったことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

600（300 BID）mg/kg/日の雄および 1 例の雌でフィブリノゲンの上昇（個々の動物の投与前値との比較）が認められ（最大 2.09 倍），炎症が示唆されたが，関連する病理組織学的所見は認められなかった。また，600（300 BID）mg/kg/日の雄 1 例でナトリウム（0.96 倍）およびクロール（0.93 倍）の低下（投与前値との比較）が認められた。これらの低下は消化管内容物の喪失によるものであり，嘔吐の所見と一致する変化であった。さらに，600（300 BID）mg/kg/日の雌雄では，尿 pH が対照群と比較して低値を示したが（0.73～0.80 倍），これに関連する一般状態の変化または病理組織学的所見は認められなかった。これらの臨床病理検査値の変化は，変化の程度が小さく，また，関連する病理組織学的所見が認められなかったことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

NOAEL は 600 mg/kg/日（検討した最高用量）であり，この NOAEL における C_{max} および AUC_{24} は，ヒトにニルマトレルビル/リトナビル（300/100 mg BID）を投与した際のニルマトレルビルの C_{max} および AUC_{24} のそれぞれ 34 倍および 22 倍であった。

4.3.2.3. サルを用いた 1 ヵ月間（1 日 2 回）経口投与毒性試験

雌雄のカニクイザルにニルマトレルビルを 0（溶媒対照），40（20 BID），100（50 BID）または 600（300 BID）mg/kg/日の用量で 1 日 2 回 28 日間経口投与して毒性を評価した。また，2 週間の休薬期間を設けて回復性を評価した（[redacted]GR125 試験，概要表 2.6.7.7D）。

試験期間中，すべての動物は生存した。体重，摂餌量，心電図パラメータ（心拍数ならびに RR，PR，QRS，QT および QTc 間隔），心電図波形，眼科学的検査所見，器官重量，剖検所見および病理組織学的検査所見においてニルマトレルビル投与に関連した影響はみられず，毒性変化はみられなかった。

ニルマトレルビル投与に関連する一般状態の変化は，600（300 BID）mg/kg/日で投与後または一晩経過後にみられた散発的な嘔吐のみであった。ニルマトレルビル投与に関連する臨床病理検査の所見は，600（300 BID）mg/kg/日の雌雄でみられた ALT（投与前値と比較して 1.63～3.53 倍），AST（2.68～7.41 倍）およびフィブリノゲン（1.20～1.91 倍）の上昇のみであった。フィブリノゲンの上昇は対照群でもみられたが，その程度はニルマトレルビル投与群でわずかに大きかった。これらの変化は，その程度が小さく，関連する一般状態の変化および病理組織学的所見がみられなかったことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。AST および ALT が上昇した雄について，投与期間終了時に剖検したため ALT および AST についての回復性を評価できなかったが，休薬期間終了時に臨床病理検査値の変化はみられなかった。

NOAEL は最高用量の 600 mg/kg/日（検討した最高用量）であり，この NOAEL における C_{max} および AUC_{24} は，ヒトにニルマトレルビル/リトナビル（300/100 mg BID）を投与した際のニルマトレルビルの C_{max} および AUC_{24} のそれぞれ 28 倍および 18 倍であった。

4.4. 遺伝毒性試験

ニルマトレルビルについて，細菌を用いる復帰突然変異試験，in vitro 染色体異常誘発試験（ヒトリンパ芽球様 TK6 細胞を用いる小核試験）およびラットを用いた in vivo 小核試験からなる一連の遺伝毒性試験を実施した。In vitro 試験はすべて，適用されるガイドラインの上限濃度または細胞毒性もしくは不溶性により制限された濃度を最高濃度とし，外因性代謝活性化系の存在下および非存在下で実施した。

ニルマトレルビルは，in vitro または in vivo のいずれの試験においても遺伝毒性を示さなかった（[redacted]試験，[redacted]試験，[redacted]GR276 試験，概要表 2.6.7.8A，2.6.7.8B，2.6.7.9）。

4.5. がん原性試験

ニルマトレルビルのがん原性試験は実施していない。

4.6. 生殖発生毒性試験

4.6.1. ラットを用いた受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験

雌雄 Wistar Han ラットにニルマトレルビルを 0（溶媒対照），60, 200 または 1000 mg/kg/日の用量で経口投与し，雌雄の受胎能に対する影響を評価した（[redacted]GR146 試験，概要表 2.6.7.12）。

ニルマトレルビル投与に関連した一般毒性（雄），性周期，交尾日数，生殖パラメータ（交配率および受胎率）への影響ならびに帝王切開時の所見はみられなかった。ニルマトレルビル投与に関連する変化として交配前の 1000 mg/kg/日（雌）において体重増加がみられたが，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

本試験では，ニルマトレルビル投与に関連した毒性がみられなかったことから，雌雄の一般毒性および受胎能に関する NOAEL は最高用量の 1000 mg/kg/日であり，この NOAEL における C_{max} および AUC_{24} は，ヒトにニルマトレルビル/リトナビル（300/100 mg BID）を投与した際の C_{max} および AUC_{24} のそれぞれ 16 倍および 5.3 倍であった。

4.6.2. ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

妊娠した雌の Wistar Han ラットにニルマトレルビルを 0（溶媒対照），100，300 または 1000 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日～妊娠 17 日に経口投与した（[redacted]GR132 試験，概要表 2.6.7.13A）。本試験では，妊娠ラットの着床から硬口蓋の閉鎖までの期間にニルマトレルビルを曝露し，ニルマトレルビル投与による妊娠ラットおよび胚・胎児の発達への影響ならびに TK を評価した。

ニルマトレルビル投与に関連した母動物の死亡，一般状態の変化，ならびに体重，体重増加量および摂餌量の変化が認められなかったことから，ニルマトレルビル投与による母動物への影響はみられなかった。また，ニルマトレルビル投与に関連した卵巣および子宮パラメータ，胎児体重ならびに胎児の外表，内臓および骨格への影響はみられなかった。

以上の結果から，母動物の一般毒性および生殖毒性ならびに胚・胎児発生毒性に対する NOAEL は最高用量である 1000 mg/kg/日であり，この NOAEL における C_{max} および AUC_{24} は，ヒトにニ

ルマトレルビル/リトナビル（300/100 mg BID）を投与した際のニルマトレルビルの C_{max} および AUC_{24} のそれぞれ 21 倍および 9.8 倍であった。

4.6.3. ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

妊娠した雌の New Zealand White ウサギにニルマトレルビルを 0（溶媒対照），100，300 または 1000 mg/kg/日の用量で妊娠 7 日～妊娠 19 日に経口投与した（[redacted]GR126 試験，概要表 2.6.7.13B）。本試験では，妊娠ウサギの着床から硬口蓋の閉鎖までの期間にニルマトレルビルを曝露し，ニルマトレルビル投与による妊娠ウサギおよび胚・胎児の発達への影響ならびに TK を評価した。

ニルマトレルビル投与に関連した母動物の死亡はみられなかった。ニルマトレルビル投与に関連した母動物の体重増加量の減少および摂餌量低下が 1000 mg/kg 日でみられたが，対照群との差は小さく体重への影響がみられなかったことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。ニルマトレルビル投与に関連する毒性変化として，対照群と比較して胎児体重の低下（対照群の 0.91 倍）が 1000 mg/kg/日でみられた。ニルマトレルビル投与に関連した母動物の剖検所見，卵巣および子宮パラメータ，胎児生存率ならびに胎児の外表，内臓および骨格への影響はみられなかった。

母動物の一般毒性および生殖毒性に関する NOAEL は 1000 mg/kg/日と考えられた。胚・胎児発生に関する NOAEL は胎児体重の低下がみられたことから 300 mg/kg/日（ヒトの C_{max} および AUC_{24} の 14 倍および 3.6 倍の曝露量）であったが，ニルマトレルビル投与に関連した重度の発生毒性（胎児異常および胚・胎児死亡など）は最高用量の 1000 mg/kg/日［ヒトにニルマトレルビル/リトナビル（300/100 mg BID）投与時の C_{max} および AUC_{24} に対して 32 倍および 13 倍の曝露量］までみられなかった。

4.6.4. ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

妊娠 Wistar Han ラットにニルマトレルビルを 0，100，300 または 1000 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日～授乳 20 日まで，1 日 1 回経口投与した（00655272 試験，概要表 2.6.7.14）。

F_0 世代の生存，一般状態，体重，摂餌量，妊娠期間，分娩および剖検にニルマトレルビル投与に関連した影響は認められなかった。1000 mg/kg/日で妊娠中および授乳中の F_0 に毒性学的意義の乏しい体重増加量への影響として，投与開始直後（妊娠 6～7 日）には体重増加量が減少したが，妊娠 19～20 日および妊娠中の投与期間全体（妊娠 6～20 日）の評価では体重増加量の増加が認められた。しかし，体重への影響はなく，妊娠 7 日で対照群の 1.00 倍，妊娠 20 日で 1.07 倍であった。授乳期間中にはわずかな体重増加量の増加が 1000 mg/kg/日で授乳初期に認められたが（授乳 1～7 日で対照群の 1.12～1.18 倍），授乳終了までに正常に復した。これらの変化も体重には影響を及ぼさず，授乳 1 日で対照群の 1.06 倍，授乳 21 日では 1.07 倍であった。

F_1 世代では，1000 mg/kg/日で離乳前期間中の体重および体重増加量に，ニルマトレルビル投与に関連するが毒性学的意義の乏しい変化が認められた。出生後 10～17 日の間に体重増加量の減少が雌雄で認められ，出生後 17 日における雌雄の体重は対照群の 0.92 倍となった。同用量での出生後 17～21 日における体重増加量は概して対照群と同程度であったが，体重は出生後 21 日でも依存として低かった（対照群と比較し，雄で 0.93 倍，雌で 0.94 倍）。この変化は一過性で出生後 10 日までの体重は対照群と同程度であったこと，また離乳前から回復の兆候がみられ離

乳後までは持続しなかったことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。F_1 世代の他の評価項目にニルマトレルビル投与に関連した影響は認められなかった。

以上のように毒性学的意義のある所見が認められなかったことから，ニルマトレルビルを Wistar Han ラットの F_0 雌に経口投与したときの F_0 母動物および F_1 出生児の生殖発生に関する NOAEL はいずれも 1000 mg/kg/日であると考えられ，この NOAEL における C_{max} および AUC_{24} は，ヒトにニルマトレルビル/リトナビル（300/100 mg BID）を投与した際のニルマトレルビルの C_{max} および AUC_{24} のそれぞれ 21 倍および 9.8 倍であった。

4.7. 局所刺激性試験

ニルマトレルビルの局所刺激性試験は実施していない。

4.8. その他の毒性試験

4.8.1. 光毒性試験

紫外可視吸光度を評価したところ，モル吸光係数は閾値である 1000 L mol^{-1} cm^{-1} を上回らなかったことから，ニルマトレルビルは光毒性のリスクを有しないことが示された。

4.8.2. 抗原性試験

ニルマトレルビルの抗原性試験は実施していない。

4.8.3. 免疫毒性試験

ニルマトレルビルの免疫毒性試験は実施していない。

4.8.4. 毒性発現の機序に関する試験

ニルマトレルビルの毒性発現の機序に関する試験は実施していない。

4.8.5. 依存性試験

ニルマトレルビルの依存性試験は実施していない。

4.8.6. 代謝物の毒性試験

ニルマトレルビルの代謝物を投与する独立した試験は実施していない。ニルマトレルビルのヒト特有の代謝物は認められていない。ヒト肝ミクロソームおよびヒト肝細胞を用いた in vitro 代謝試験で検出された代謝物はいずれも毒性試験で用いた動物種（ラットおよびサル）でも認められた。

4.8.7. 不純物の毒性試験

Wistar Han ラットに複数の不純物（ *不純物A ， *不純物B ， *不純物C ， *不純物D ， *不純物E ， *不純物F または *不純物G ）を添加したニルマトレルビルを 0 または 200 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，2 週間経口投与したときの毒性を評価した（[redacted]GR206 試験，概要表 2.6.7.17）。いずれの評価項目においても，毒性学的意義のある所見は認められず，ニルマトレルビル投与に関連した毒性学的意義の乏しい変化もラット 14 日間試験（[redacted]GR276 試験）および 1 ヵ月間試験（[redacted]GR122 試験）で認められたものと同様であった。体重，摂餌量，眼科学

的検査，臨床病理学的検査，臓器重量，剖検および病理組織学的検査に不純物添加の有無による差は認められなかった。

4.8.8. その他の試験

ニルマトレルビルのその他の試験は実施していない。

4.9. 所見と薬物動態の関係

ラット，サルおよびウサギへの経口投与後にニルマトレルビルの血漿中濃度を測定したところ，曝露量（C_{max} および AUC_{24}）に一貫した性差は認められず，ニルマトレルビルの曝露量は用量の増加に伴って増加した。

ニルマトレルビルの各用量で得られた TK パラメータに関連する曝露量比（ヒトの推定曝露量との比）を Table 10 に示した。各用量で認められた主な所見も記載した。曝露量比は，動物で得られたニルマトレルビルの C_{max} および AUC_{24} を，ヒトにニルマトレルビル/リトナビルの予定治療用量（300/100 mg BID）を投与したときのニルマトレルビルの C_{max} および AUC_{24} と比較することにより算出した。なお，ラット，サルおよびヒトにおける血漿タンパク結合率の差は 2 倍未満であったが，ウサギの血漿タンパク結合率は特に高用量で低かった（ウサギ血漿の非結合率はヒトでの非結合率の 2 倍超）ため，ヒトとの曝露量比はすべての動物種において総濃度での曝露量を基に算出した。

Table 10.　主な所見とニルマトレルビル投与量

主な所見	投与量 (mg/kg/日)	C_{max} (μg/mL)[a]	AUC_{24} (μg•h/mL)[a]	曝露比 (C_{max})[b]	曝露比 (AUC_{24})[b]
ラット（雌雄各 15 匹/群）を用いた GLP 適用 2 週間強制経口投与毒性試験（[redacted]GR276 試験）					
PT↑（雄）	60	13.3	17.2	4.2	0.31
上記に加えて，APTT↑（雄），門脈周囲肝細胞肥大（雌）	200	27.1	80.5	8.6	1.5
上記に加えて，PT↑（雌），APTT↑（雌），血小板数↑，赤血球パラメータ↓（雌），フィブリノゲン↑（雌），グロブリン↑，コレステロール↑（雌），ALP↓（雌），A/G 比↓（雌），尿 pH↓（雄），心臓重量↓（雌），肝臓重量↑，門脈周囲肝細胞肥大（雄），門脈周囲肝細胞空胞化（雌），甲状腺濾胞細胞肥大	1000 (NOAEL)	51.5	292	16	5.3
ラット（雌雄各 15 匹/群）を用いた GLP 適用 1 ヵ月間強制経口投与毒性試験（[redacted]GR122）					
流涎，肝臓重量↑，甲状腺濾胞細胞肥大，下垂体前葉内分泌細胞空胞化（雄）	60	12.8	19.2	4.1	0.35
上記に加えて，軟便，血小板数↑，PT↑（雄），門脈周囲肝細胞肥大	200	26.0	94.9	8.2	1.7
上記に加えて，PT↑（雌），門脈周囲肝細胞空胞化（雌）	1000 (NOAEL)	44.5	548	14	10
カニクイザル（雌雄各 3 匹/群）を用いた GLP 適用 1 日 2 回 15 日間強制経口投与毒性試験（[redacted]GR289 試験）					
所見なし	40 (20 BID)	2.42	9.61	0.77	0.18
嘔吐↑	100 (50 BID)	11.8	52.6	3.7	0.96
上記に加えて，体重↓（雄），フィブリノゲン↑，尿 pH↓	600 (300 BID) (NOAEL)	106	1220	34	22
カニクイザル（雌雄各 3 匹/群，対照群および高用量群では雌雄各 5 匹/群）を用いた GLP 適用 1 日 2 回 1 ヵ月間強制経口投与毒性試験（[redacted]GR125）					
所見なし	40 (20 BID)	1.38	5.62	0.44	0.10
所見なし	100 (50 BID)	7.80	45.9	2.5	0.84
嘔吐↑，ALT↑（雄），AST↑，フィブリノゲン↑	600 (300 BID) (NOAEL)	87.5	991	28	18
ラットを用いた受胎能に関する試験（[redacted]GR146）[c]					
所見なし	60	13.3	17.2	4.2	0.31
所見なし	200	27.1	80.5	8.6	1.5
交配前期間の体重増加量↑（雌）	1000 (NOAEL)	51.5	292	16	5.3

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]GR132）					
所見なし	100	29.0	75.5	9.2	1.4
所見なし	300	43.2	346	14	6.3
所見なし	1000 (母動物および胚胎児発生に関するNOAEL)	65.4	535	21	9.8
ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]GR126）					
所見なし	100	17.0	98.7	5.4	1.8
所見なし	300 (胚胎児発生に関するNOAEL)	42.9	195	14	3.6
胎児体重↓ 母動物体重増加量↓，摂餌量↓	1000 (母動物に関するNOAEL)	99.6	689	32	13
ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（[redacted]GR149）[d]					
所見なし	100	29.0	75.5	9.2	1.4
所見なし	300	43.2	346	14	6.3
F_0：体重増加量↓（妊娠 6-7 日），体重増加量↑（妊娠 19-20 日），体重増加量↑（妊娠 6-20 日），体重増加量↑ （授乳 1-7 日） F_1：体重増加量↓（出生後 10-17 日），体重↓（出生後 17 および 21 日）	1000 (NOAEL)	65.4	535	21	9.8
ラットを用いた不純物の 2 週間経口投与毒性試験（[redacted]GR206）[e]					
流涎，PT↑（雄），APTT↑（雄），グロブリン↑（雄），総タンパク↑（雄），A/G 比↓（雄），肝重量↑（雌）	200	27.1	80.5	8.6	1.5

a. AUC および C_{max} の値は総血漿中濃度で示す。各値は特記しない限り投与期間終了付近で得られたものである。
b. ヒトにニルマトレルビル/リトナビルの治療用量（300/100 mg BID）を投与したときのニルマトレルビルの総濃度曝露量（C_{max}：3.16 µg/mL，AUC_{24}：54.7 µg•h/mL）と動物での曝露量との比較から，曝露量比を算出した。
c. 血漿中濃度は 1 時点（投与期間の試験 10 日における投与後 0.5 時間）のみ測定した。曝露量および比は[redacted]GR276 試験のデータを示した。
d. 曝露量および比は[redacted]GR132 試験のデータを示した。
e. 曝露量および比は[redacted]GR276 試験のデータを示した。

4.10. 標的臓器毒性

非臨床試験の結果から，ヒトに関連する可能性のある標的臓器は特定されなかった。げっ歯類に特異的な肝ミクロソームの代謝酵素誘導に伴う変化がみられた臓器は，肝臓，甲状腺および下垂体であった。ラットを用いた 2 週間および 1 ヵ月間投与毒性試験において，肝臓重量が対

照群と比較して増加した。肝臓重量の増加は，軽微から軽度の肝臓（門脈周囲の肝細胞の肥大および空胞化），甲状腺（濾胞細胞の肥大）および下垂体（1 ヵ月間投与毒性試験の雄で前葉内分泌細胞の細胞質空胞化）でみられた変化を伴っていたものの，概ね回復性が認められ，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。これらの変化は肝酵素誘導に対するラット特異的な反応と一致しており，その結果，サイロキシンの異性化亢進，血清中甲状腺刺激ホルモンの増加ならびに甲状腺の濾胞細胞の肥大および下垂体前葉における前葉内分泌細胞の空胞化が生じることが報告されている[17,18,19]。この作用メカニズムは，げっ歯類とヒトとで甲状腺ホルモンの血漿中半減期および輸送タンパク質への結合に著しい種差があるため，通常ヒトに対してはほとんどまたは全く関連しないと考えられている[19]。

5. 総括及び結論

COVID-19 は，2019 年 12 月に，SARS-CoV-2 に起因する新たな死に至る可能性のある呼吸器感染症として特定された[3]。SARS-CoV-2 は ACE2 を介して細胞に感染し，主な感染部位は肺および気管支の上皮細胞である[4]。SARS-CoV-2 の M^{pro} はウイルスに組み込まれている，ウイルス複製に不可欠な酵素である[6]。M^{pro} は，ウイルスの p1a および p1ab ポリタンパク質を複数の接合部位で消化し，RdRp，ヘリカーゼおよび M^{pro} 自体を含むウイルス複製および転写に重要な一連のタンパク質を生成する。コロナウイルスの M^{pro} に近縁のヒト類似体は知られていない[7]。M^{pro} は，ウイルスの複製サイクルにとって必須の機能を持つ重要な酵素であり，また，近縁のヒト相同体が存在しないことから，抗ウイルス薬の標的として有望視されている[8]。

ニルマトレルビルは，生化学的酵素アッセイで SARS-CoV-2 M^{pro} に対して有効であることが示された（K_i = 0.00311 µmol/L）経口投与可能な M^{pro} 阻害薬である。ヒトコロナウイルスの M^{pro} は構造的に類似しており，酵素の活性部位が高度に保存されていることから，その他のコロナウイルス（SARS-CoV-1，HCoV-229E，MERS，HCoV-OC43，HCoV-HKU1 および HCoV-NL63）の M^{pro} に対するニルマトレルビルの阻害能も確認され，広範な抗コロナウイルス活性スペクトルの可能性が示されている。ニルマトレルビルはまた，コロナウイルスの M^{pro} に対して選択性を示し，一連のヒトプロテアーゼおよび HIV プロテアーゼに対してはほとんどまたは全く活性を示さなかった。

SARS-CoV-2 に対するニルマトレルビルの抗ウイルス活性は数種の細胞株で評価した。そのうち最も生理的に適切と考えられる細胞株は dNHBE 細胞で，これに対する感染後 3 日の EC_{50} 値および EC_{90} 値はそれぞれ 0.0618 および 0.181 µmol/L であった。

P-gp をノックアウトした VeroE6 を用いた検討で，ニルマトレルビルはアルファ（B.1.1.7），ガンマ（P.1），デルタ（B.1.617.2），ラムダ（C.37），ミュー（B.1.621）およびオミクロン（B.1.1.529）の各変異株に対して USA-WA1/2020 野生株の 3 倍以内の EC_{50} 値で抗ウイルス活性を示した。ベータ株（B.1.351）は検討した変異株の中では最も感受性が低く，ニルマトレルビルの EC_{50} 値は USA-WA1/2020 株の 3.7 倍であった。また，デルタ変異株の臨床分離株 4 株に対しても，ニルマトレルビルは VeroE6 TMPRSS 細胞を用いた検討で USA-WA1/2020 株の約 2 倍以内の EC_{50} 値で抗ウイルス活性を示した。

ニルマトレルビル耐性ウイルスの選択試験は，M^{pro} 変異を導入するか，もしくは培養細胞をニルマトレルビル濃度を漸増させて継代する手法により，SARS-CoV-2 またはそのマウスサロゲートである MHV を用いて実施した。他のプロテアーゼ阻害薬を用いた耐性試験により，ニルマトレルビルとの交叉耐性も報告されている[10,11]。

遺伝子導入もしくは培養細胞から単離したこれらの M^{pro} 変異ウイルスのうち，いくつか（Y54A，F140A，S144E，S144L，S144P，S144T，E166V および H172Y）は生存しなかったため評価できなかったが，その他の変異は野生型と比較した EC_{50} 値の上昇の程度によって以下に示す 3 種類に分類された。

- 2 倍未満：G15S，E55L，L89F，K90R，P132H，H164N，A173V および Q189K

- 2～10 倍：S144A，E166A，T304I，T21I+T304I，L50F+T304I，T135I+T304I および A173V+F140L

- 14 倍超：E166V，T304I+A173V，L50F+E166V，T21I+T304I+S144A および L50F+E166A+L167F

M^{pro} におけるほとんどの点変異やいくつかの二重変異によるニルマトレルビル感受性の低下（EC_{50} 値上昇）は野生型の 10 倍以下で，臨床での血中濃度以下であったが，三重変異といくつかの二重変異では 14 倍を超える EC_{50} 値の上昇が認められ，臨床での血中濃度を上回った。これらのウイルスは長期間にわたって継代培養されたものであり，その臨床における適合性や自然発生的な耐性との関連は不明である。

ニルマトレルビルは，マウスに適合する SARS-CoV-2 ウイルスに感染させた BALB/c（ニルマトレルビル単独またはリトナビルとの併用）および 129 マウスを用いた in vivo モデルで抗ウイルス効果を示した。ニルマトレルビルは，感染後 4 時間から 300 または 1000 mg/kg，または感染後 12 時間から 1000 mg/kg の経口 BID 投与で，溶媒対照と比較して肺ウイルス力価を減少させ，疾患の指標（体重減少および肺の病理組織学的所見）を改善した。リトナビルは単独では本感染モデルにおいて抗ウイルス活性を示さなかったが，ニルマトレルビルとの併用によって肺ウイルス力価を減少させ，肺保護効果も改善した。この併用効果は，リトナビルの CYP3A 阻害によりニルマトレルビルの曝露量が増加したことによると考えられる。

副次的薬理試験において，一連の受容体，トランスポーター，イオンチャネルおよび酵素に対するニルマトレルビルの in vitro 活性を評価した結果，いずれの標的に対しても機能的活性または酵素活性に 50%を超える阻害は認められなかった。

安全性薬理試験を実施して，重要な器官（中枢神経系，呼吸系および心血管系）に対するニルマトレルビルの影響を評価した。雄の Wistar Han ラットにニルマトレルビルを 1000 mg/kg の用量まで経口投与したとき，FOB パラメータへの影響は認められなかったが，自発運動量の定量的評価では，1000 mg/kg 群で溶媒対照群と比較して，評価期間の最初の 5 分間に垂直運動の平均回数の減少，評価期間の最後の 30 分間に水平運動および垂直運動の平均回数の増加が認められた。これらの所見のヒトへの外挿性は不明である。1000 mg/kg 群では，溶媒対照群と比較して，一過性の呼吸数および分時換気量の増加も認められた。カニクイザルにニルマトレルビルを 150（75 BID）mg/kg/日の用量で投与したとき，収縮期，拡張期および平均血圧の上昇ならびに心拍数減少などの軽微かつ一過性の影響が認められ，これに伴い RR，PR および QT 間隔が延長した。QTc 間隔には短縮が認められた。不整脈は認められなかった。ニルマトレルビルを 150（75 BID）mg/kg/日の用量で投与したとき，LV +dP/dt max の低下も認められた。測定値はすべて初回投与後 24 時間以内に溶媒対照を投与したときのレベルに回復し，また，hERG，モルモット摘出心臓またはラット摘出大動脈を用いたアッセイでは臨床的意義のあるニルマトレルビルの影響は認められなかった。

安全性薬理パラメータへの影響は臨床において心電図検査などによってモニタリング可能であり，ラットおよびサルを用いた最長 1 ヵ月間の反復投与毒性試験（GLP 適用）では関連する一般状態の変化または病理組織学的所見は認められなかった。サルの 15 日間および 1 ヵ月間投与試験では心電図データも収集しており，これらの試験では，心電図パラメータ（心拍数ならび

に RR，PR，QRS，QT および QTc 間隔）または心電図波形の変化は認められなかった。ニルマトレルビルの薬物動態プロファイルを種々の in vitro および in vivo 試験によって広範に評価した。

ラットおよびサルを用いた重要な反復投与毒性試験では，ニルマトレルビルの曝露量は用量の増加に伴って増加し，一貫した性差は認められなかった。

ニルマトレルビルの受動的膜透過性は低く，ラット，サルおよびヒトの血漿タンパクとの結合率は中程度であった。ニルマトレルビルは，評価に用いたすべての動物種において，赤血球と比較して血漿中に多く分布した。ウサギ血漿では濃度依存的なタンパク結合率の変化がみられたが，ラット，サルおよびヒト血漿では濃度依存的なタンパク結合率の変化はみられなかった。[^{14}C]ニルマトレルビル由来の放射能は血液脳関門を通過せず，ニルマトレルビルが P-gp の基質であることと一致した。

ニルマトレルビルの酸化的代謝に寄与する主要な酵素は CYP3A4 であった（$f_m = 0.99$）。臨床においては，CYP3A4 を阻害してニルマトレルビルの血漿中濃度を上昇させる目的でリトナビルが併用される。In vivo では，ニルマトレルビル未変化体がラット，サルおよびヒトの血漿中で最も多く検出された薬物関連物質であり，M4（PF-07329268）がサル血漿中で最も多く検出された代謝物であった。ニルマトレルビルとリトナビルを併用したヒトのマスバランス試験では，ニルマトレルビル関連物質の大部分は未変化体として排泄された（尿中および糞中にそれぞれ 55%および 28%）。

ニルマトレルビル/リトナビルは臨床において CYP3A4 および P-gp の基質と薬物相互作用を起こす可能性が示されたが，リトナビル単独によるものを超える薬物相互作用はほとんど示さないと考えられた。他のトランスポーターを介した臨床的意義のある薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられた。

ニルマトレルビルの一般毒性は，ラットおよびカニクイザルを用いた 1 ヵ月間までの GLP 適用反復投与毒性試験 4 試験で評価した。いずれの試験においても毒性学的に意義のある変化はみられず，各試験の NOAEL は最高用量で，1 ヵ月間試験での NOAEL におけるヒトにニルマトレルビル/リトナビルを 300/100 mg で投与した際の総濃度に対する曝露比（C_{max} および AUC_{24}）はラットで 14 倍および 10 倍，サルで 28 倍および 18 倍であった。ニルマトレルビル投与に関連する変化として，ラット 1 ヵ月間投与毒性試験で散発的な流涎および軟便，サルで散発的な嘔吐およびそれに伴う軽微な体重減少がみられたものの，毒性学的意義の乏しい変化であった。ラットの臨床病理検査において，軽度の炎症または血液凝固系経路に関連した変化がみられたが，関連する一般状態の変化または病理組織学的所見は認められず，回復性も認められたことから毒性学的意義は乏しく，臨床においてモニタリング可能な変化と考えられた。サルでは 1 ヵ月間投与毒性試験の最高用量で ALT，AST およびフィブリノゲンの増加がみられたが，概して回復性があり，関連する一般状態の変化または病理組織学的所見はみられなかったことから毒性学的意義は乏しく，臨床においてモニタリング可能な変化と考えられた。ラット 2 週間および 1 ヵ月間投与毒性試験の両試験において，対照群と比較して肝臓重量の増加がみられた。肝臓重量の増加は，軽微から軽度の肝臓（門脈周囲の肝細胞の肥大および空胞化），甲状腺（濾胞細胞の肥大）および下垂体（1 ヵ月間投与毒性試験の雄で前葉内分泌細胞の細胞質空胞化）の変化を伴っていたものの，概ね回復性が認められ，毒性学的意義の乏しい変化と考えら

れた。これらの変化は肝酵素誘導に対するラット特異的な反応と一致しており，その結果，サイロキシンの異性化亢進，血清中甲状腺刺激ホルモンの増加ならびに甲状腺の濾胞細胞の肥大および下垂体前葉における前葉内分泌細胞の空胞化が生じることが報告されている[17,18,19]。この作用メカニズムは，げっ歯類とヒトとで甲状腺ホルモンの血漿中半減期および輸送タンパク質への結合に著しい種差があるため，通常ヒトに対してはほとんどまたは全く関連しないと考えられている[19]。

ニルマトレルビルは一連の生殖発生毒性試験，すなわちラットを用いた受胎能に関する試験，ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験ならびにラットを用いた発生前及び発生後の発生並びに母体の機能に関する試験において 1000 mg/kg/日までの用量で毒性学的意義のある影響を示さず，同用量での各試験における臨床での総濃度に対する曝露比（C_{max} および AUC_{24}）は 16 倍および 5.3 倍，21 倍および 9.8 倍，32 倍および 13 倍，ならびに 21 倍および 9.8 倍であった。ラットを用いた受胎能に関する試験および胚・胎児発生に関する試験ではニルマトレルビルは毒性学的意義のある作用を示さなかった。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では，1000 mg/kg/日で毒性変化と考えられる胎児の体重低下（対照群の 0.91 倍）が認められ，この用量では母動物に毒性学的意義の乏しい変化と考えられる体重変化および摂餌量への影響がみられたものの，胎児の形態または胚・胎児の生存率にニルマトレルビル投与に関連する影響は認められなかった。ラットを用いた発生前及び発生後の発生並びに母体の機能に関する試験では F_0 および F_1 世代に毒性学的意義のある影響は認められなかった。これらの結果から，ニルマトレルビルのヒトの生殖発生能に対するリスクはほとんどないと考えられた。

ニルマトレルビルは，in vitro 遺伝毒性試験で変異原性および染色体異常誘発性を示さず，ラットを用いた GLP 適用 2 週間反復投与毒性試験の一部として実施した in vivo 小核試験においても陰性であった。また，紫外線および可視光線の吸収プロファイルより，ニルマトレルビルに光毒性のリスクがないことが示された。

ラットを用いた不純物の 2 週間経口投与毒性試験において，種々の不純物（ *不純物A ， *不純物B ， *不純物C ， *不純物D ， *不純物E ， *不純物F または *不純物G ）を添加したニルマトレルビルを 200 mg/kg/日で投与したが，安全性プロファイルの変化は認められなかった。

ニルマトレルビルとリトナビルの併用投与毒性試験は実施していない。リトナビルは非臨床および臨床安全性プロファイルが十分に評価されている市販薬であり，また，ニルマトレルビルの非臨床および臨床安全性プロファイルも良好である。そのため，両薬物の併用による毒性の重複または増悪は予想されない。また，ニルマトレルビル単独の非臨床試験において，ニルマトレルビルの臨床での曝露を上回る広い安全域が得られている（2.4.4 項を参照）。このため，併用投与毒性試験からは，ニルマトレルビルおよびリトナビルの既知の毒性プロファイルを超える情報が得られる可能性は低いと考えられ，このアプローチは，FDA や EMA など海外の複数の保健当局で合意されている。

以上の非臨床試験成績は，ニルマトレルビルの臨床適用を支持するものであった。

6. 参考文献

1 Dinnon KH 3rd, Leist SR, Schäfer A, et al. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. Nature. 2020;586:560-6.

2 Leist SR, Dinnon KH, Schafer A, et al. A mouse-adapted SARS-CoV-2 induces acute lung injury and mortality in standard laboratory mice. Cell 2020;183:1070-85.

3 Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. Nature 2020;579:270-3.

4 Sungnak W, Huang N, Becavin C, et al. SARS-CoV-2 Entry Factors are Highly Expressed in Nasal Epithelial Cells Together with Innate Immune Genes. Nat Med 2020;26:681-7.

5 Zhang L, Lin D, Sun X, et al. Crystal Structure of SARS-CoV-2 Main Protease Provides a Basis for Design of Improved Alpha-Ketoamide Inhibitors. Science 2020;368:409-12.

6 Kim JC, Spence RA, Currier PF, et al. Coronavirus protein processing and RNA synthesis is inhibited by the cystine proteinase inhibitor E64d. Virology 1995;208:1-8.

7 Boras B, Jones RM, Anson BJ, et al. Preclinical characterization of an intravenous coronavirus 3CL protease inhibitor for the potential treatment of COVID19. Nat Commun 2021;12:6055.

8 Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V, et al. An Overview of Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus (SARS-CoV) 3CL Protease Inhibitors: Peptidomimetics and Small Molecule Chemotherapy. J Med Chem 2016;59:6595-6628.

9 Hoffman RL, Kania RS, Brothers MA, et al. Discovery of ketone-based covalent inhibitors of coronavirus 3CL proteases for the potential therapeutic treatment of COVID-19. J Med Chem 2020;63:12725-47.

10 Zhou Y, Gammeltoft K, Ryberg L et al. Nirmatrelvir Resistant SARS-CoV-2 Variants with High Fitness in Vitro. bioRxiv. （プレプリント）https://doi.org/10.1101/2022.06.06.494921.

11 Jochmans, D, Liu C, Donkers K, et al. The substitutions L50F, E166A and L167F in SARS-CoV-2 3CLpro are selected by a protease inhibitor in vitro and confer resistance to nirmatrelvir. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2022.06.07.495116.

[12] Deng X, StJohn S, Osswald H, et al. Coronaviruses resistant to a 3C-like protease inhibitor are attenuated for replication and pathogenesis, revealing a low genetic barrier but high fitness cost of resistance. J Virol 2014;88:11886-98.

[13] Di L, Whitney-Pickett C, Umland JP, et al. Development of a new permeability assay using low-efflux MDCKII cells. J Pharm Sci 2011;100:4974-85.

[14] 厚生労働省「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」平成 30 年 7 月 23 日付け薬生薬審発 0723 第 4 号

[15] In Vitro Drug Interaction Studies. Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-mediated Drug Interactions. In: Guidance for Industry. Silver Spring, MD: Food and Drug Administration; 2020

[16] Guideline on the investigation of drug interactions. In: European Medicines Agency. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2, 21 June 2012.

[17] Childs GV, Ellison DG, Lorenzen JR, et al. Immunocytochemical studies of gonadotropin storage in developing castration cells. Endocrinology 1982;111:1318-28.

[18] Greaves P. Endocrine glands. In: Greaves P, editor. Histopathology of preclinical toxicity studies. 4th ed, Amsterdam, Elsevier, 2012a:772-73.

[19] Rosol T, De Lellis R, Harvey P, et al. Endocrine System. In: Haschek W, Rousseau C, Wallig M, eds. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Academic Press, London, UK Vol 1. 3rd ed. 2013:2391-492.

[20] Prescott-Mathews JS, Wolf DC, Wong BA, et al. Methyl tert-butyl ether causes alpha2μ-globulin nephropathy and enhanced renal cell proliferation in male Fischer-344 rats. Toxicol Appl Pharmacol 1997;143:301-14.

[21] Greaves P. Urinary tract. In: Greaves P, editor. Histopathology of preclinical toxicity studies. 4th ed, Amsterdam, Elsevier, 2012b:562-6.

[22] Maronpot RR, Yoshizawa K, Nyska A, et al. Hepatic enzyme induction: histopathology. Toxicologic Pathology 2010;38:776-95.