TABLE OF CONTENTS

LIST OF FIGURES 1
1. 緒言 2

LIST OF FIGURES

Figure 1. ニルマトレルビルの構造式 2

1. 緒言

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）による感染症（COVID-19）の世界的な流行による脅威のため，COVID-19 治療薬の開発は急務であると言える。

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[1]。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[1,2]。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］をコードしている[3]。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[4]。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[5]。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[6]。

ニルマトレルビル［開発番号：PF-07321332，化学名：(1R,2S,5S)-N-{(1S)-1-Cyano-2-[(3S)-2-oxopyrrolidin-3-yl]ethyl}-3-[(2S)-3,3-dimethyl-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)butanoyl]-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxamide，Figure 1］は強力かつ選択的な SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害薬であり，コロナウイルス科全体の 3CL プロテアーゼに対して広範な阻害活性を示すことから，抗ウイルス効果を発揮する可能性が示唆されている。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[7]。また，リトナビルは CYP3A を介したニルマトレルビルの代謝を阻害することにより，ニルマトレルビルの血漿中濃度を増加させる。

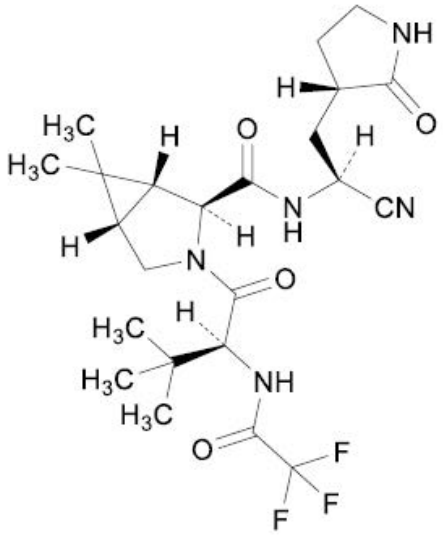


Figure 1.　ニルマトレルビルの構造式

ニルマトレルビルの効能・効果および用法・用量は添付文書（案）（1.8.1 項）に記載した。

参考文献

1 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.

2 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.

3 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.

4 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.

5 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.

6 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;59:6595-628.

7 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.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 2
本項で使用する用語・略語 4
1. まとめ 6
2. 効力を裏付ける試験 9
2.1. In vitro 試験 9
2.1.1. 作用機序 9
2.1.2. ニルマトレルビルの選択性 11
2.1.3. ニルマトレルビルの抗ウイルス活性 12
2.1.4. SARS-CoV-2 の主要変異株に対する作用 15
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
2.1.6. 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 18
2.1.7. MHV ウイルスを用いた in vitro 耐性ウイルス選択試験 19
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 19
2.2. In vivo 試験 21
2.2.1. Balb/c マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおける in vivo 作用 21
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 24
2.2.3. 129 マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおける in vivo 作用 26
3. 副次的薬理試験 28
3.1. 各種受容体，イオンチャネル，トランスポーターおよび酵素等に対するオフターゲット作用 28
3.2. 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に対する作用 28
3.3. PDE サブタイプに対する作用 29
4. 安全性薬理試験 29
4.1. hERG カリウムチャネルに対する作用 30
4.2. ラット摘出大動脈標本に対する作用 30
4.3. 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作用 30
4.4. ラットにおける神経機能および肺機能に対する作用 31
4.5. 無麻酔，テレメトリー装着サルにおける心血管系評価 31

5. 薬力学的薬物相互作用試験 32
6. 考察及び結論 32
7. 図表 34
8. 参考文献 35

LIST OF TABLES

Table 1. SARS M^{pro} に対するニルマトレルビルおよび PF-07329268 の生化学的活性 9
Table 2. コロナウイルスの M^{pro} に対するニルマトレルビルの生化学的活性 9
Table 3. SARS-CoV-2 M^{pro} の主なニルマトレルビル接触残基における変異 11
Table 4. 他の哺乳類およびウイルスのプロテアーゼに対するニルマトレルビルの選択性 12
Table 5. VeroE6 細胞における SARS-CoV-2 に対するニルマトレルビルおよび PF-07329268 の in vitro 抗ウイルス活性，細胞毒性および TI 13
Table 6. NLRV を導入した A549-ACE2 細胞におけるニルマトレルビルおよびリトナビルの抗ウイルス活性および細胞毒性 14
Table 7. 感染後 3 日および 5 日の dNHBE 細胞におけるニルマトレルビルおよびレムデシビルの EC_{50} 値 14
Table 8. 関連ヒトコロナウイルスに対するニルマトレルビルの作用 15
Table 9. ニルマトレルビルの主要変異株に対する活性の要約 17
Table 10. P-gp ノックアウト Vero E6 細胞より選択された SARS-CoV-2 変異ウイルスに対するニルマトレルビルの活性 20
Table 11. A549-ACE2 細胞より選択された SARS-CoV-2 変異ウイルスに対するニルマトレルビルの活性 21
Table 12. ニルマトレルビルの安全性薬理試験の概要 29

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 10
Figure 2. ニルマトレルビル（PF-07321332）の Balb/c マウスにおける体重に対する影響 22
Figure 3. ニルマトレルビル（PF-07321332）の Balb/c マウスにおける肺ウイルス力価に対する作用 23
Figure 4. Balb/c マウスにおける非結合型血漿中薬物濃度 23
Figure 5. SARS-CoV2-MA10 感染 Balb/c マウスにおけるニルマトレルビル（PF-07321332）の作用；肺の免疫組織化学的検査 24

Figure 6. ニルマトレルビル（PF-07321332），リトナビルまたは両者の併用による Balb/c マウスにおける肺ウイルス力価および病理組織学的スコアに対する作用 25
Figure 7. ニルマトレルビル（PF-07321332）の 129 マウスにおける体重に対する影響 27
Figure 8. ニルマトレルビル（PF-07321332）の 129 マウスにおける肺ウイルス力価に対する作用 28

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
ACE2	angiotensin converting enzyme 2：アンジオテンシン変換酵素 2
ATP	adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
BID	twice daily：1 日 2 回（投与）
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
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
EV	enterovirus：エンテロウイルス
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
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
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
HRV	human rhinovirus：ヒトライノウイルス
IC_{50}	50% inhibitory concentration：50%阻害濃度
K_i	inhibition constant：阻害定数
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
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
MTBE	methyl tert-butyl ether
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
NOAEL	no-observed-adverse-effect level：無毒性量
NOEL	no-observed-effect level：無作用量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構

略号，用語	省略していない表現または定義
PD	pharmacodynamics：薬力学
PDE	phosphodiesterase：ホスホジエステラーゼ
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
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
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
TI	therapeutic index：治療指数
TMPRSS	transmembrane serine protease：Ⅱ型膜貫通型セリンプロテアーゼ
Vero	monkey kidney cells：サル腎臓細胞

1. まとめ

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[1]。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[1,2]。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］をコードしている[3]。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[4]。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[5]。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[6]。

ニルマトレルビル（PF-07321332）は強力かつ選択的な SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害薬（IC_{50} 値：0.0192 µmol/L，K_i 値： 0.00311 µmol/L）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ことから，抗ウイルス効果を発揮する可能性が示唆されている。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[7]。

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。生理学的に適切と考えられる dNHBE 細胞に SARS-CoV-2 を感染させたときのニルマトレルビルの抗ウイルス活性に関する EC_{50} 値および EC_{90} 値はそれぞれ 61.8 および 181 nmol/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。

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 FRET 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。

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 種の変異ウイルスはレムデシビルに対しては感受性を保持していた。

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[8]。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[9]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。なお，これらの培養細胞由来のウイルスは長期間にわたって継代培養された結果選択されたものであり，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。

以上のニルマトレルビルに対する耐性変異は，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約 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。

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。これらの結果は，臨床試験において認められたニルマトレルビルの有効性と符合した。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（2.6.4.5 項）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. 効力を裏付ける試験

2.1. In vitro 試験

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学的手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，ニルマトレルビルはTable 1に示すようにSARS-CoV-1 M^{pro}も0.0289 µmol/LのIC_{50}値で阻害した（PF-07321332_[redacted]_090608試験，PF-07321332_[redacted]_091415試験）。

Table 1. SARS M^{pro} に対するニルマトレルビルおよび PF-07329268 の生化学的活性

由来	化合物	IC_{50} µmol/L (CI)	K_i µmol/L (95% CI)
SARS-CoV-1[a]	ニルマトレルビル	0.0289 (0.0244–0.0342)	ND
	PF-07329268	ND	ND
SARS-CoV-2[b]	ニルマトレルビル	0.0192 (0.0135–0.0250)	0.00311 (0.00131–0.00491)
	PF-07329268	0.0175 (0.0153, 0.0200)[c]	0.00315 (0.00236, 0.00422)[c]

ニルマトレルビルは未変化体であり，その主要酸化代謝物は PF-07329268 である。
a. PF-07321332_[redacted]_091415 試験
b. PF-07321332_[redacted]_090608 試験
c. n = 2 のため，CI の代わりに個別値を示した。

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[4]，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。これらの結果から，ニルマトレルビルが α および β コロナウイルス属に対し，0.0391～0.479 µmol/L の IC_{50} 値で広範な阻害活性を有することが確認された（Table 2，PF-07321332_[redacted]_091415 試験）。

Table 2. コロナウイルスの M^{pro} に対するニルマトレルビルの生化学的活性

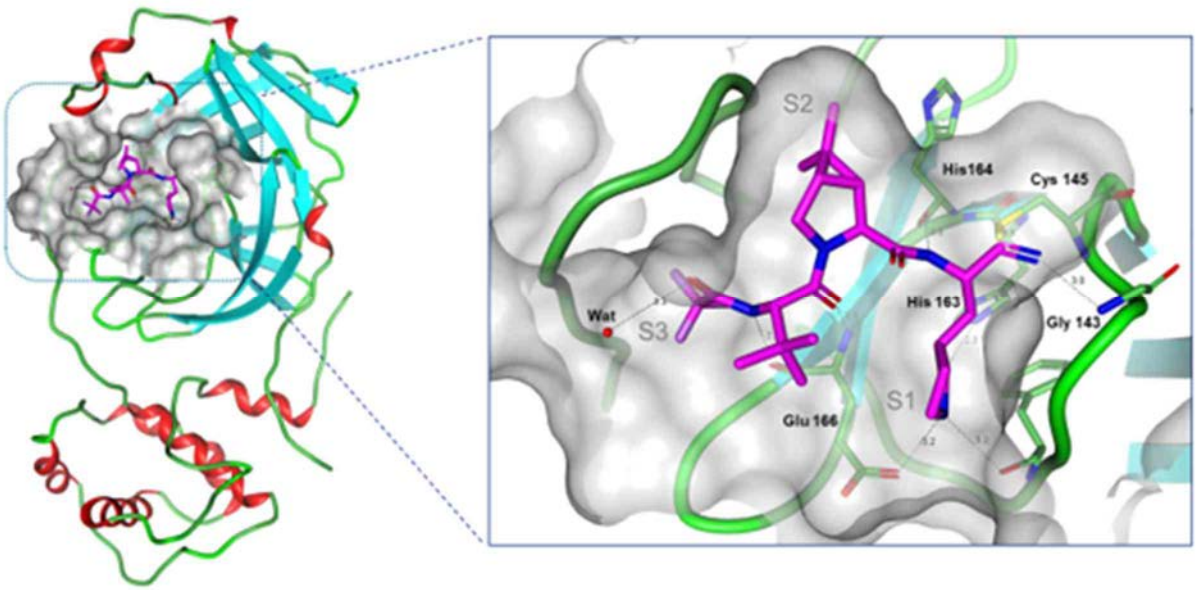
ウイルス		IC_{50} µmol/L (95% CI)[a]
α-CoV[b]	NL63-CoV	0.479 (0.242–0.949)
	229E-CoV-2	0.113 (0.0417–0.304)
β-CoV[b]	MERS-CoV	0.402 (0.218–0.741)
	HKU1-CoV	0.0391 (0.0256–0.0598)
	OC43-CoV	0.0777 (0.0312–0.194)

a. n = 3
b. PF-07321332_[redacted]_091415 試験

共結晶構造により示されるように，ニルマトレルビルは 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）。ニルマトレルビル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[7]。

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 M^{pro} 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 3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 3. SARS-CoV-2 M^{pro} 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

2.1.2. ニルマトレルビルの選択性

種々のヒト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（Table 4）。

さらに，ヒト RD および H1 HeLa 細胞におけるそれぞれ EV71 および HRV1B ウイルスによる CPE を指標としてニルマトレルビルの細胞性抗ウイルス活性を評価した（PF-07321332_[redacted]_041406 試験）。非感染 RD および HeLa 細胞におけるニルマトレルビルの細胞毒性も評価した。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）。

Table 4.　他の哺乳類およびウイルスのプロテアーゼに対するニルマトレルビルの選択性

プロテアーゼ [a]	IC_{50} µmol/L
ヒトカテプシン B[b]	>100
ヒトカテプシン D	>100
ヒトカテプシン L[b]	>100
ヒトカスパーゼ 2	>100
ウシキモトリプシン	>100
ヒトキモトリプシン	>10
ヒトエラスターゼ	>100
HIV-1	>100
ヒトトロンビン	>100

a. PF-07321332_[redacted]_091415 試験
b. n = 3。その他のプロテアーゼはすべて n = 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条件となるよう，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。CPE および細胞毒性のいずれのエンドポイントにおいても，細胞の生存率は [redacted]（[redacted] 社）を用いて ATP を定量することにより生存細胞数を測定する，発光細胞生存率アッセイによって評価した。

ニルマトレルビルは CP-100356 の非存在下で SARS-CoV-2 による CPE を阻害し，EC_{50} 値は 4.48 µmol/L，EC_{90} 値は 9.46 µmol/L であった。また，2.0 µmol/L の CP-100356 存在下での EC_{50} 値は 0.0745 µmol/L，EC_{90} 値は 0.155 µmol/L であった。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（Table 5）。

主要代謝物 PF-07329268 の CP-100356 非存在下における SARS-CoV-2 による CPE の阻害に関する EC_{50} 値および EC_{90} 値はともに 3 µmol/L 超であった。また，2.0 µmol/L 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 であった。細胞毒性は，3 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（Table 5）。

Table 5.　VeroE6 細胞における SARS-CoV-2 に対するニルマトレルビルおよび PF-07329268 の in vitro 抗ウイルス活性，細胞毒性および TI

ニルマトレルビル				ニルマトレルビル ＋ CP-100356[a]			
EC_{50}[b] µmol/L (95% CI)	EC_{90}[b] µmol/L (95% CI)	CC_{50}[b] µmol/L (95% CI)	TI[c]	EC_{50}[b] µmol/L (95% CI)	EC_{90}[b] µmol/L (95% CI)	CC_{50}[b] µmol/L (95% CI)	TI[c]
4.48 n = 20 (3.55–5.65)	9.46 n = 20 (7.60–11.8)	>100 または >10 n = 10 (ND)	>21.5	0.0745 n = 20 (0.0665–0.0834)	0.155 n = 20 (0.138–0.173)	>100 または>10 n = 10 (ND)	>1250
PF-07329268				**PF-07329268 + CP-100356[a]**			
EC_{50}[b] µmol/L (95% CI)	EC_{90}[b] µmol/L (95% CI)	CC_{50}[b] µmol/L (95% CI)	TI[c]	EC_{50}[b] µmol/L (95% CI)	EC_{90}[b] µmol/L (95% CI)	CC_{50}[b] µmol/L (95% CI)	TI[c]
>3.33 または >3 n = 4 (ND)	>3.33 または >3 n = 4 (ND)	>3.33 または >3 n = 2 (ND)	ND	0.690 n = 3 (0.210–2.27)	1.44 n = 3 (0.437–4.72)	>3.33 または >3 n = 2 (ND)	>5.08

PF-07321332_[redacted]_052017 試験

a. CP-100356はP-gp阻害薬で，2.0 µmol/Lの固定濃度で本試験に使用した。

b. 数値は幾何平均値を示す。EC_{50}曲線はHill係数が3を超えた場合は3でフィッティングし，最高用量で50%以上の効果を示す場合に定義された。30%を超える細胞毒性が検出された場合は，対応する濃度のデータをEC_{50}値の算出から除外した。

c. CC_{50}値をEC_{50}値で除して個々のTI値を算出し，累積TIの平均値を求めた。

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，ナノルシフェラーゼレポーターウイルス（NLRV）法によって評価した（PF-07321332_[redacted]_041209 試験，Table 6）。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。

Table 6.　NLRV を導入した A549-ACE2 細胞におけるニルマトレルビルおよびリトナビルの抗ウイルス活性および細胞毒性

ニルマトレルビル			リトナビル		
EC_{50} µmol/L (95% CI)	**EC_{90} µmol/L** (95% CI)	**CC_{50}[a] µmol/L** (95% CI)	**EC_{50} µmol/L** (95% CI)	**EC_{90} µmol/L** (95% CI)	**CC_{50}[a] µmol/L** (95% CI)
0.0779 (0.0505–0.120) n = 28	0.215 (0.146–0.317) n = 28	>3 (ND) n = 14	>3 (ND) n = 2	>3 (ND) n = 2	>3 (ND) n = 1

PF-07321332_[redacted]_041209 試験
数値は幾何平均値を示す。
a. CC_{50} 値は非感染 A549-ACE2 細胞を用い，ヒアミン（100 µmol/L）を陽性対照として測定した。

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（Table 7）。

Table 7.　感染後 3 日および 5 日の dNHBE 細胞におけるニルマトレルビルおよびレムデシビルの EC_{50} 値

	ニルマトレルビル							
ウイルス回収日	**EC_{50}[a] (µmol/L)**			**幾何平均値 (95% CI)**	**EC_{90}[a] (µmol/L)**			**幾何平均値 (95% CI)**
	実験 1	**実験 2**	**実験 3**		**実験 1**	**実験 2**	**実験 3**	
3	0.0757	0.0678	0.0461	0.0618 (0.0324–0.118)	0.157	0.141	0.2676	0.181 (0.0769–0.425)
5	0.0555	0.0231	0.0271	0.0326 (0.0102–0.104)	0.0924	0.0436	0.0440	0.0561 (0.0192–0.164)
	レムデシビル							
ウイルス回収日	**EC_{50}[a] (µmol/L)**			**幾何平均値 (95% CI)**	**EC_{90}[a] (µmol/L)**			**幾何平均値 (95% CI)**
	実験 1	**実験 2**	**実験 3**		**実験 1**	**実験 2**	**実験 3**	
3	0.0019	0.0053	0.0026	0.00297 (0.000805–0.0109)	0.0043	0.0099	0.0322	0.0111 (0.000901–0.137)
5	0.0024	0.0069	0.0098	0.00545 (0.000885–0.0336)	0.008	0.0136	0.0349	0.0156 (0.0024–0.0993)

PF-07321332_[redacted]_010204 試験
a. EC_{50} 曲線は Hill 係数が 3 を超えた場合は 3 でフィッティングし，最高用量で 50%以上の効果を示す場合に定義された。

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評価した（Table 8，PF-07321332_[redacted]_104426 試験）。また，ニルマトレルビルの細胞毒性を非感染 VeroE6 細胞で評価した。本試験は P-gp 阻害薬 CP-100356 の存在

下および非存在下で実施した。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（2.0 µmol/L）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（Table 8，PF-07321332_[redacted]_092314 試験）。また，非感染 MRC-5 細胞を用いてニルマトレルビルの細胞毒性も評価した。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評価した（Table 8，PF-7321332_[redacted]_015423 試験）。本試験は CP-100356（1.0 µmol/L）の存在下および非存在下で実施した。また，ニルマトレルビルの細胞毒性を非感染 Vero81 細胞で評価した。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。

Table 8.　関連ヒトコロナウイルスに対するニルマトレルビルの作用

ウイルス	宿主細胞	ニルマトレルビル (µmol/L)				ニルマトレルビル ＋CP-100356[a] (µmol/L)			
		EC_{50}[b] (95% CI)	EC_{90}[b] (95% CI)	CC_{50}[c]	TI[d]	EC_{50}[b] (95% CI)	EC_{90}[b] (95% CI)	CC_{50}[c]	TI[d]
SARS-CoV-1	VeroE6	12.3 (8.95-16.8) n = 12	25.5 (18.6-35.0) n = 12	>100 n = 6	>8.95	0.151 (0.108-0.212) n = 12	0.317 (0.225-0.446) n = 12	>100 n = 6	>756
HCoV-229E	MRC-5	0.190 (0.0583- 0.621) n = 3	0.620 (0.166-2.32) n = 3	>100 n = 3	>567	NA	NA	NA	NA
MERS-CoV	Vero81	5.41 (4.92-5.94) n = 16	11.6 (10.1-13.3) n = 16	>100 n = 8	>18.7	0.166 (0.145-0.191) n = 16	0.351 (0.301-0.409) n = 16	>100 n = 8	>623

PF-07321332_[redacted]_104426, PF-07321332_[redacted]_092314 および PF-07321332_[redacted]_015423 試験

a. CP-100356はP-gp阻害薬で，1.0または2.0 µmol/Lの固定濃度で本試験に使用した。

b. 数値は幾何平均値を示す。EC_{50}曲線はHill係数が3を超えた場合は3でフィッティングし，最高用量で50%以上の効果を示す場合に定義された。30%を超える細胞毒性が検出された場合は，対応する濃度のデータをEC_{50}値の算出から除外した。

c. CC_{50}値の幾何平均値が検討した最高濃度を上回ったため，CIは算出しなかった。

d. CC_{50} 値を EC_{50} 値で除して個々の TI 値を算出し，累積 TI の平均値を求めた。

NA: 実施せず

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）。

以上の結果を Table 9 に要約する。

Table 9.　ニルマトレルビルの主要変異株に対する活性の要約

細胞	測定法	ニルマトレルビルのEC_{50}幾何平均値（nmol/L）								
		USA-WA1/2020	**アルファ B.1.1.7**	**ベータ B.1.351**	**ガンマ P.1**	**ラムダ B1.1.1.37/ C.37**	**デルタ B.1.617.2**	**ミュー B.1.621**	**オミクロン B1.1.529 (BA.1)**	**オミクロン B1.1.529 (BA.2)**
VeroE6 P-gpノックアウト[a]	CPE	108 (n=6)	75.3 (n=3)	171 (n=3)	87.7 (n=3)	59.5 (n=3)	NC	65.1 (n=3)	--	--
VeroE6 P-gpノックアウト[b]	qPCR	38 (n=8)	41 (n=3)	127.2[e] (n=4) 141[f] (n=4)	24.9 (n=3)	21.2 (n=4)	15.9 (n=3)	25.7 (n=3)	16.2 (n=3)	--
VeroE6 TMPRSS2 +CP-100356[a]	CPE	92.8 (n=6)	170 (n=3)	217 (n=3)	204 (n=3)	93.0 (n=3)	82.2 (n=3)	138 (n=3)	--	79 (n=3)
HeLa-ACE2[c]	MTT[d]	207 (n=2)	118 (n=2)	225 (n=2)	--	--	169 (n=2)	--	70 (n=2)	--
Vero-TMPRSS2 +CP-100356[c]	MTT[d]	38 (n=1)	22 (n=1)	121 (n=1)	--	--	73 (n=1)	--	23 (n=1)	--

野生型としてUSA-WA1/2020株を用いた。
NC：VeroE6 P-gpノックアウト細胞ではCPEを生じなかったため計算できず，--：実施せず
a. PF-07321332_[redacted]_104040試験
b. PF-07321332_[redacted]_042713試験
c. PF-07321332_[redacted]_091706試験
d. IC_{50}値
e. ベータK90R+P252L株
f. ベータK90R株

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（2.6.2.2.1.7 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阻害活性（K_i 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阻害活性（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[a]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（879 nmol/L）[b]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 の配列において約 0.2%以下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。

2.1.6. 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。

---

[a] 野生型の EC_{50} 値は，生理学的に適切と考えられる dNHBE 細胞における感染後 3 日の EC_{50} 値である 61.8 nmol/L（2.6.2.2.1.3 項）を基準とした。

[b] 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投与 5 日における C_{min} の予測中央値（1417 ng/mL，2.7.2.4.3.2 項）の非結合画分。これは上述した野生型の EC_{50} 値の約 14 倍に相当する。

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（25.4 µmol/L）または 40 倍（33.9 µmol/L）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（2.6.2.2.1.6 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（42.34 µmol/L；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[10]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。

2.1.8. 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，Table 10）。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（2.6.6.2.1.6 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。

Table 10. P-gp ノックアウト Vero E6 細胞より選択された SARS-CoV-2 変異ウイルスに対するニルマトレルビルの活性

ウイルス変異	ニルマトレルビル		レムデシビル	
	EC_{50}幾何平均値（nmol/L）	**EC_{50}値の変化（野生型に対する倍率）**	**EC_{50}幾何平均値（nmol/L）**	**EC_{50}値の変化（野生型に対する倍率）**
野生型[a]	34.8 (n = 23)	NA	29.1 (n = 31)	NA
T304I	118 (n = 3)	3.4[b]	19.5 (n = 3)	0.7
T21I+T304I	275 (n = 3)	7.9[c]	24.4 (n = 4)	0.8
L50F+T304I	205 (n = 4)	5.9[c]	30.3 (n = 4)	1.0
T135I+T304I	134 (n = 4)	3.8[d]	32.2 (n = 4)	1.1
T21I+T304I+S144A	967 (n = 4)	28[c]	17.0 (n = 4)	0.6
T304I+A173V	702 (n = 3)	20[c]	25.4 (n = 4)	0.9

PF-07321332_[redacted]_113117 試験
a. 過去の試験の集積値。
b. $p < 0.05$（片側分散分析および Dunnett の t 検定；以下同じ）
c. $p < 0.001$
d. $p = 0.002$

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。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。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（Table 11）。

Table 11. A549-ACE2 細胞より選択された SARS-CoV-2 変異ウイルスに対するニルマトレルビルの活性

Mutant	ニルマトレルビル		レムデシビル	
	EC_{50}幾何平均値（nmol/L）	EC_{50}値の変化（野生型に対する倍率）	EC_{50}幾何平均値（nmol/L）	EC_{50}値の変化（野生型に対する倍率）
野生型	61 (n = 3)	NA	261 (n = 3)	NA
A173V	57 (n = 3)	0.9	113 (n = 3)	0.4
A173V+F140L	614 (n = 3)	10[a]	248 (n = 3)	1.1

PF-07321332_[redacted]_065112 試験
抗ウイルス活性の測定は VeroE6 TMPRSS2 細胞を用いて実施した。
a. $p < 0.001$（Dunnett の t 検定）

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[8]。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[9]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. 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。

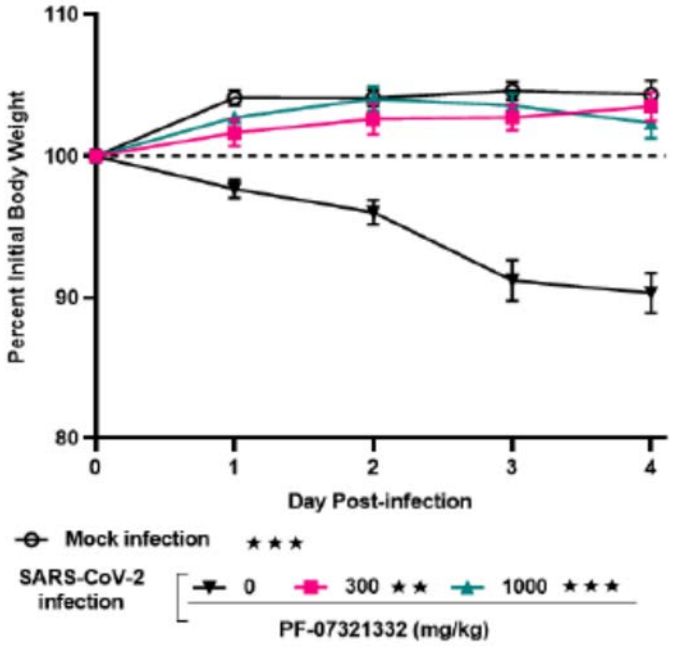
2.2.1. Balb/c マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおける in vivo 作用

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（各 6 匹/群）。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 $p < 0.001$，Figure 2），また Figure 3 に示すように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。

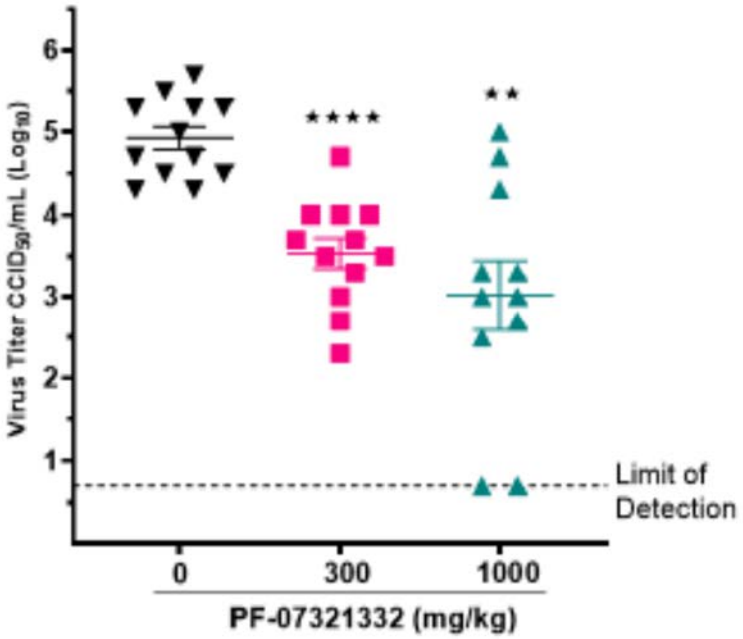
本試験における非結合型血中濃度を in vitro での SARS-CoV-2 に対する EC_{90} 値である約 181 nmol/L（薬物処置開始から 3 日後；PF-07321332_[redacted]_010204 試験）と比較した。BALB/c マウスでのニルマトレルビルの非結合型 C_{min} は 300 および 1000 mg/kg BID で EC_{90} 値のそれぞれ約 0.9 倍および約 4 倍であったことから，ニルマトレルビルが SARS-CoV-2 のマウス適合モデルにおいて C_{min} をほぼ EC_{90} 値に維持することで抗ウイルス作用を発揮すること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

Figure 2.　ニルマトレルビル（PF-07321332）の Balb/c マウスにおける体重に対する影響



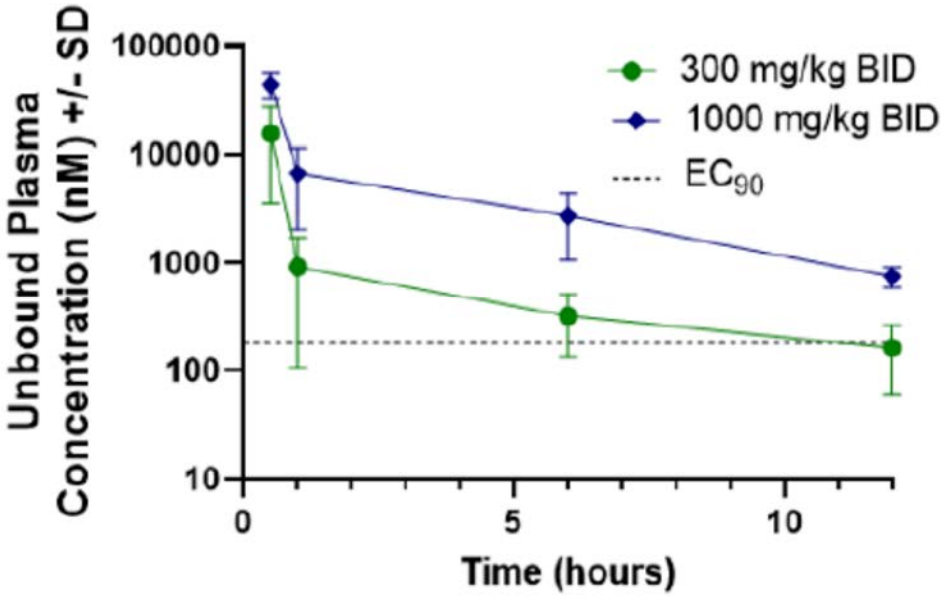
ウイルス感染および薬物投与を行わない模擬感染マウスのデータを Mock infection として示す。体重は毎日測定して試験 0 日（100%）との比較で示した。**$p < 0.01$, ***$p < 0.001$（対照群との比較，Dunnett の多重比較）

Figure 3. ニルマトレルビル（PF-07321332）の Balb/c マウスにおける肺ウイルス力価に対する作用



**p = 0.002, ****p < 0.0001（対照群との比較，Dunnett の多重比較）

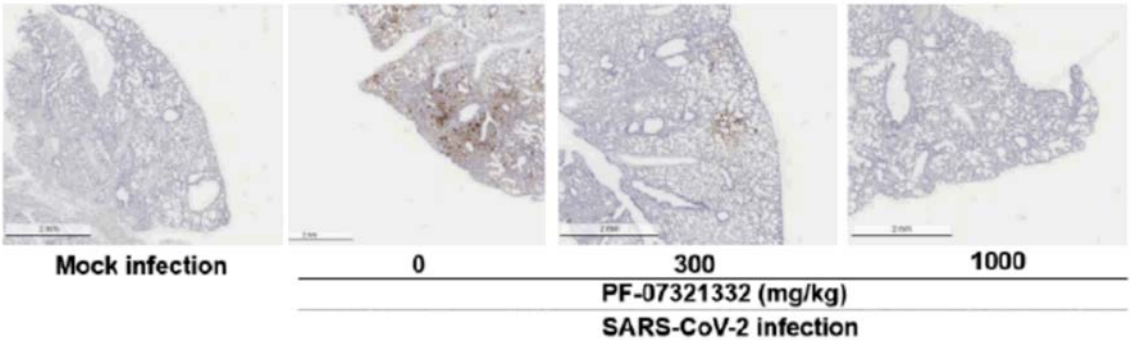
Figure 4. Balb/c マウスにおける非結合型血漿中薬物濃度



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（Figure 5）。

Figure 5.　SARS-CoV2-MA10 感染 Balb/c マウスにおけるニルマトレルビル（PF-07321332）の作用；肺の免疫組織化学的検査



N タンパク質抗原が茶色で染色されている。

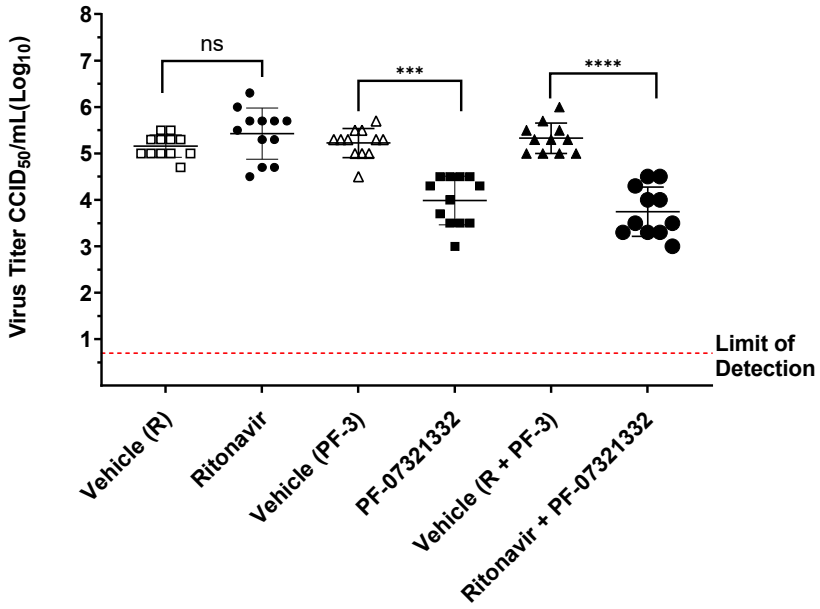
2.2.2. Balb/c マウス適合 SARS-CoV-2 モデルにおけるニルマトレルビル，リトナビルおよび両者の併用による in vivo 作用

BALB/c マウスに SARS-CoV-2-MA10 ウイルスを鼻腔内接種した。ニルマトレルビル（300 mg/kg BID），リトナビル（50 mg/kg BID）または両者の併用で，感染 4 時間後から 4 日間，計 8 回経口投与した（6 匹/群）。ニルマトレルビとリトナビルで異なる溶媒を用いたため，各単独投与群および併用群のそれぞれについて溶媒対照群を設けた。前項と同様に試験 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）。1 回目の試験は曝露量データから被験物質のクロスコンタミネーションが少量ながら認められた等の理由により，データ集計に用いなかった。以下はその後実施した 2 回の試験（それぞれ試験 2，試験 3 とする）について記述する。なお，試験 2 および 3 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試験 2，試験 3 および併合データでそれぞれ約 1.1 log_{10}，1.4 log_{10} および 1.2 log_{10} 減少させたが，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試験 2，試験 3 および併合データでそれぞれ約 1.7 log_{10}，1.6 log_{10} および 1.6 log_{10} の減少が認められた（Figure 6）。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（試験 2；試験 3 の病理組織学的検査結果は未入手，Figure 6）。

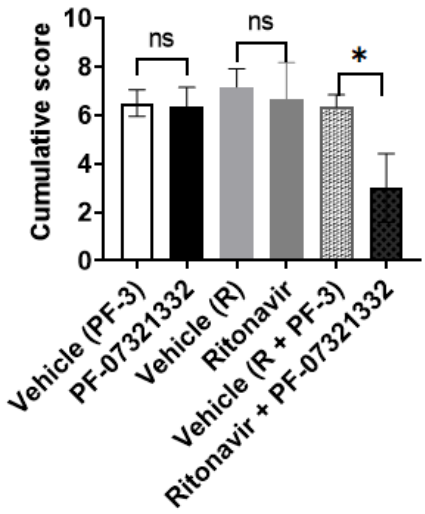
Figure 6. ニルマトレルビル（**PF-07321332**），リトナビルまたは両者の併用による **Balb/c** マウスにおける肺ウイルス力価および病理組織学的スコアに対する作用

A. 肺ウイルス力価（試験 **2** および **3** の併合データ）



PF-3, PF-07321332：ニルマトレルビル，R：リトナビル，ns：有意差なし
***p = 0.0005, ****p < 0.0001（対照群との比較，片側分散分析および Kruskal-Wallis の多重比較）

B. 病理組織学的スコア（試験 2）



PF-3, PF-07321332：ニルマトレルビル，R：リトナビル，ns：有意差なし
*p < 0.05（対照群との比較，片側分散分析および Kruskal-Wallis の多重比較）

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。試験 2 では，ニルマトレルビル単独およびリトナビルとの併用でのニルマトレルビルの C_{min} は EC_{90} 値のそれぞれ 0.9 倍および 8 倍であった。また，試験 3 ではニルマトレルビル単独およびリトナビルとの併用でのニルマトレルビルの C_{min} は EC_{90} 値のそれぞれ 2.9 倍および 28 倍であった。

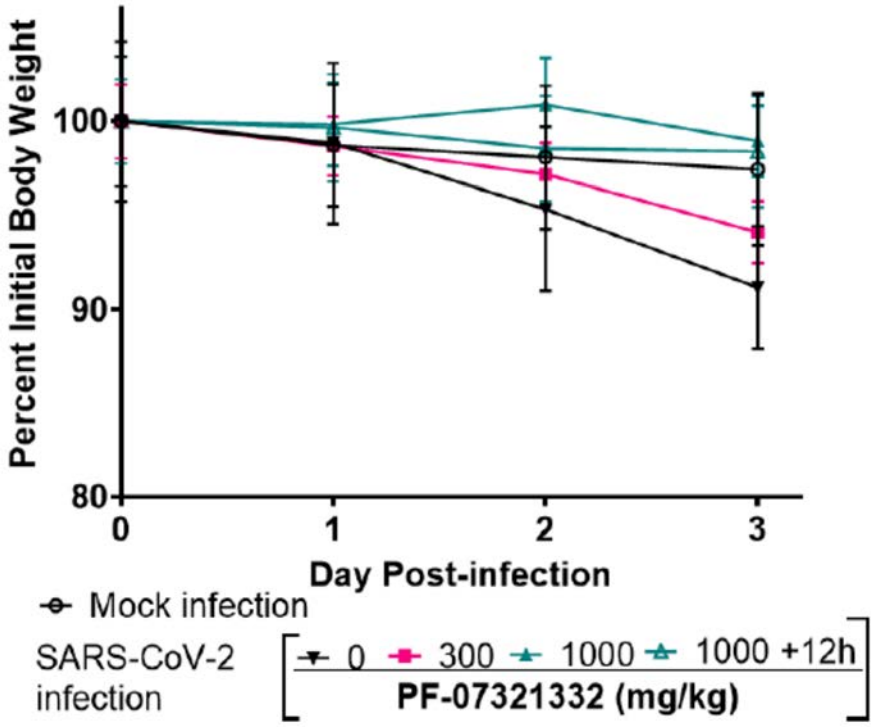
これらの結果から，前項（2.6.2.2.2.1 項）に示した SARS-CoV-2-MA10 ウイルス感染 BALB/c マウスにおけるニルマトレルビルの抗ウイルス活性が確認された。また，リトナビル単独ではウイルス複製や病理組織学的スコアに対して改善効果を示さなかった。ニルマトレルビルとリトナビルの併用により，各薬物の単独投与と比較して肺組織に対する保護効果が改善したが，これはリトナビルの CYP3A 阻害によりニルマトレルビルの曝露量が増加したことによると考えられる。

2.2.3. 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（Figure 7）。

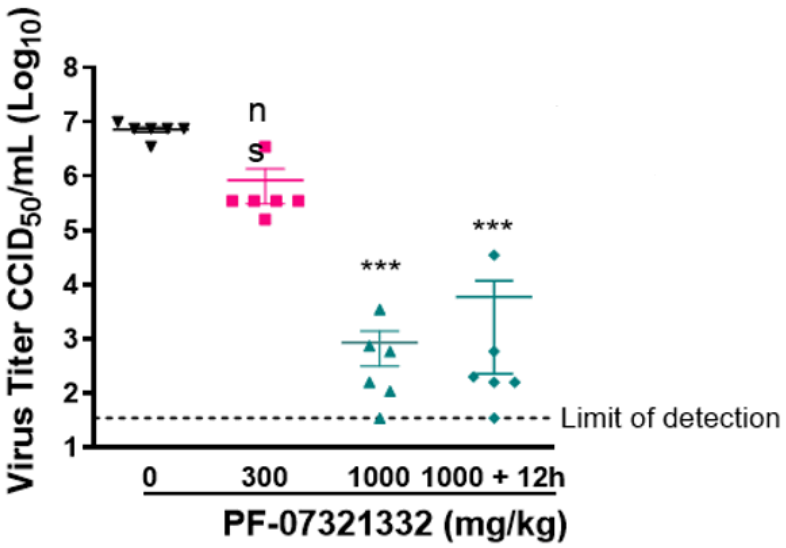
Figure 7.　ニルマトレルビル（PF-07321332）の 129 マウスにおける体重に対する影響



ウイルス感染や薬物投与を行わない模擬感染マウスのデータを Mock infection として示す。体重は毎日測定して試験 0 日（100%）との比較で示した。

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（$p < 0.001$）（Figure 8）。

Figure 8. ニルマトレルビル（PF-07321332）の 129 マウスにおける肺ウイルス力価に対する作用



***p < 0.001（溶媒対照群との比較，Kruskal-Wallis 検定），ns：有意差なし

3. 副次的薬理試験

3.1. 各種受容体，イオンチャネル，トランスポーターおよび酵素等に対するオフターゲット作用

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ニルマトレルビルの in vitro オフターゲット薬理作用を 100 µmol/L の濃度で評価した（100054569 試験）。この結果，いずれの標的に対しても 50%を超える活性は認められなかった。この評価に用いたニルマトレルビルの濃度は，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）を投与したときの非結合型 C_{max}（0.98 µg/mL = 1.96 µmol/L）[a]の 51 倍であった。

3.2. 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に対する作用

Nav1.5 ナトリウムチャネル（ピーク電流）および Cav1.2 カルシウムチャネルの電流に対するニルマトレルビルの阻害の IC_{50} 値はいずれも検討した最高濃度である 300 µmol/L を上回り（[redacted]LJ073 試験），この濃度はヒトに治療用量を投与したときの非結合型 C_{max} の 153 倍であった。

[a] 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 C_{max} 3.16 µg/mL（2.7.2.4.3.2 項）およびヒトでの非結合型分率 0.31（2.6.4.4.1 項），分子量 499.54 より算出

3.3. PDE サブタイプに対する作用

11 種類の PDE サブタイプ（1～11）に対するニルマトレルビルの阻害活性も評価した。IC_{50} 値は検討したすべての PDE サブタイプにおいて 200 µmol/L（検討した最高濃度）を上回り（[redacted]LJ074 試験），この濃度はヒトに治療用量を投与したときの非結合型 C_{max} の 102 倍であった。

以上の結果により，ニルマトレルビルが臨床的に意味のある曝露量において副次的（オフターゲット）薬理作用を示す可能性は低いことが示された。

4. 安全性薬理試験

Table 12 に示す一連の安全性薬理試験でニルマトレルビルを評価した。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。In vivo 試験では，曝露量を増加させるためニルマトレルビルを 1：1 の MTBE 溶媒和物として動物に投与し，MTBE を投与する対照群も別途設定した。

Table 12.　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。

一連の in vitro，ex vivo および in vivo 安全性薬理試験の結果，ニルマトレルビルは重要な器官（心血管系，呼吸器系および中枢神経系）の生理的機能に対して臨床的意義のある影響を及ぼさなかった。

In vivo で認められた所見は，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，高用量群のサ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）であった。これらの影響は臨床試験でモニタリングしたが，心電図の臨床的に意味のある変化とニルマトレルビル/リトナビル投与の関連は認められていない（2.7.4.4.2 項）。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（[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。以下に各試験の結果について記述する。

4.1. hERG カリウムチャネルに対する作用

ヒト胎児腎由来（HEK）細胞に発現させた hERG チャネルの電流に対するニルマトレルビルの作用を評価した（[redacted]LJ022 試験）。ニルマトレルビルは 300 µmol/L の濃度で統計的に有意な（$p < 0.05$；溶媒対照との比較）hERG 阻害作用を示し，その程度は溶媒対照の 0.5±1.2%（平均±標準誤差，$n = 4$；以下同じ）に対して 12.6±0.7%であった。30 µmol/L での hERG 阻害（4.6±3.7%）は溶媒対照と比べて統計的に有意ではなかった（$p > 0.05$）。ニルマトレルビルの hERG カリウム電流に対する IC_{50} 値は算出できず，300 µmol/L 超と判断された。この濃度はヒトに治療用量を投与したときの非結合型 C_{max} の 153 倍超であった。

陽性対照として用いたオンダンセトロンの IC_{50} 値は 1.53 µmol/L と既知の結果と同様であったことから，本試験系の妥当性および再現性が確認された。

4.2. ラット摘出大動脈標本に対する作用

ラットから摘出した大動脈組織の標本についてティッシュバスを用いた試験を実施し，血管収縮または弛緩反応を起こす可能性について評価した（[redacted]LJ076 試験）。

ニルマトレルビル（2 pmol/L～100 µmol/L）はラット摘出大動脈標本において血管収縮反応を起こさなかった（EC_{50} 値は 100 µmol/L 超；ヒトに治療用量を投与したときの非結合型 C_{max} の 51 倍超）。陽性対照として用いたフェニレフリン（α1-アドレナリン受容体作動薬）の EC_{50} 値は 22.5 nmol/L であった。

一方，ニルマトレルビルによる血管弛緩反応が認められた。KCl（30 mmol/L）で収縮させた大動脈標本にニルマトレルビル 33.3 および 100 µmol/L を添加したときの収縮率（KCl を 100%とする）はそれぞれの濃度で 57.3±5.7%および 38.3±5.6%（平均±標準誤差，$n = 3$）で，溶媒対照と比較して統計的に有意（それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.01$）であった。IC_{50} 値は 50.3 µmol/L と算出され，この濃度はヒトに治療用量を投与したときの非結合型 C_{max} の 26 倍であった。

4.3. 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作用

モルモットから摘出したランゲンドルフ灌流心モデルを用いて，ニルマトレルビル（0.03～100 µmol/L）の+dP/dT，左室圧，冠動脈潅流圧ならびに心電図パラメータ（PR，QRS および QT 間隔）に対する作用を検討した（[redacted]LJ075 試験）。

ニルマトレルビルは，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）までの濃度で心機能（+dP/dT，左室圧，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。

4.4. ラットにおける神経機能および肺機能に対する作用

ニルマトレルビルを Wistar Han ラットに単回経口投与した際の神経機能および肺機能に対する作用を評価した（[redacted]GR274 試験）。

神経機能の評価では，各 6 匹の雄ラットからなる 3 群にそれぞれ 0［溶媒：2%（v/v）ポリソルベート 80 および 0.5%（w/v）メチルセルロース 4000 cps を含む純水］，60 または 1000 mg/kg のニルマトレルビルを経口投与した。ニルマトレルビルは約 15%の MTBE を含有するため，6 匹の雄ラットからなる群を別途設け，ニルマトレルビルの高用量群と同量の MTBE（150 mg/kg）を添加した溶媒を投与して MTBE の影響を評価した。投与 1 時間後に FOB 評価を実施し，その直後に 60 分間の定量的自発運動量測定を実施した。

肺機能の評価では，6 匹の雄ラットからなる 4 群にそれぞれ 0（溶媒対照），0（MTBE 対照），60 または 1000 mg/kg のニルマトレルビルを経口投与して，投与後 6 時間にわたり全身プレスチモグラフィを用いて一回換気量，呼吸数および分時換気量を測定した。

FOB パラメータに 1000 mg/kg までのニルマトレルビルの影響は認められなかった。自発運動量の評価では，溶媒対照群と比較して，ニルマトレルビルの 1000 mg/kg 群で評価期間の最初の 5 分間に垂直運動の平均回数の減少が，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。

肺機能の評価では，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および分時換気量が増加した。

MTBE 対照群（150 mg/kg MTBE）においては，FOB，自発運動量または呼吸パラメータに MTBE による影響は認められなかった。

ラットを用いた 14 日間投与毒性試験（[redacted]GR276 試験，2.6.6.3.1.2 項）の試験 1 日における雄の総濃度 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濃度 C_{max} のそれぞれ 23 倍および 3.5 倍であった。

4.5. 無麻酔，テレメトリー装着サルにおける心血管系評価

無麻酔，非拘束のテレメトリーを装着した雄カニクイザルにニルマトレルビルを経口投与して心血管系に対する作用を評価した（[redacted]GR275 試験）。心血管系評価に先立って全例に 150（75 BID）mg/kg/日のニルマトレルビルを試験 1 日に経口投与して PK 測定を実施した。心血管系評価では 0（溶媒対照：組成は前項と同じ），0（MTBE 対照[a]），40（20 BID）または 150（75

[a] 前項の [redacted]GR274 試験と同様，ニルマトレルビルは約 15%の MTBE を含有するため，ニルマトレルビルの高用量群と同量の MTBE［22.5（11.25 BID）mg/kg/日］を添加した溶媒を投与した。

BID）mg/kg/日のニルマトレルビルを各 2 匹の雄サルからなる 4 群に，クロスオーバーデザインにて試験 9，12，16 および 19 日に経口投与した。

テレメトリーによるそれぞれの測定値は投与後の 4 つの時間帯ごと（投与後 0.75～5.5 時間，7.25～9.00 時間，9.25～16.00 時間および 16.25～20.5 時間），用量ごとに平均し，統計解析では分散分析を用いて溶媒対照群，MTBE 対照群および各用量のニルマトレルビル群を比較した。特記しない限り，以下の数値は群平均値を示す。

ニルマトレルビルのいずれの用量においても，一般状態に変化は認められなかった。

MTBE 群に所見は認められず，MTBE が心血管系に影響を及ぼさないことが示された。

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，心拍数の減少（-8～-14 bpm）が投与後 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（+3～+5 mmHg）が投与後 0.75～5.5 時間（拡張期血圧のみ）および投与後 7.25～9.00 時間に認められた。投与後 0.75～16.00 時間に RR 間隔の延長が認められ，同時点で心拍数減少がみられたことと一致していた。投与後 0.75～9.00 時間に PR 間隔および QT 間隔の延長が認められたが，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，投与後 7.25～16.00 時間に短縮（-5～-7 msec）が認められた。また，投与後 0.75～9.00 時間に LV +dP/dt max も低下（-306～-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。ニルマトレルビル 150（75 BID）mg/kg/日を投与したときの C_{max}（平均±標準偏差）は 14.7±9.24 µg/mL であった。

この試験で得られた PK データ（150 mg/kg）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（40 mg/kg：[redacted]GR289 試験，2.6.6.3.2.2 項）に基づくと，150 mg/kg および 40 mg/kg（NOEL）を投与したときの総濃度 C_{max} 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濃度 C_{max} のそれぞれ 4.7 倍および 0.54 倍であった。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

ニルマトレルビルの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6. 考察及び結論

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 値 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-CoV，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を持つ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 TMPRSS2 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。

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 FRET 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[8,9]。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。

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。

7. 図表

表および図は，本文中および 2.6.3 項（薬理試験概要表）に適宜記載した。

8. 参考文献

[1] 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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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;59:6595-628.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Deng X, StJohn SE, Osswald HL. 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.

TABLE OF CONTENTS

2.6.3.1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS 6
2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS 20
2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY 21

2.6.3.1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Nirmatrelvir

Type of Study	Species/Strain and/or Test System	Method of Administration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics					
Potency of Nirmatrelvir and PF-07329268 (M4) in M^{pro} FRET Assay	SARS-CoV-2 M^{pro}	In Vitro	No	[redacted][b]	PF-07321332_[redacted]_090608
Potency of Nirmatrelvir against a panel of viral and mammalian proteases in M^{pro} FRET Assay	Human coronavirus, mammalian and viral proteases[a]	In Vitro	No	[redacted][b], [redacted][b] and [redacted][c],	PF-07321332_[redacted]_091415
Xray Co-Crystal Structure of Nirmatrelvir bound to SARS-CoV-2 M^{pro}	SARS-CoV-2 M^{pro}	In Vitro	No	PWRDM[j]	PF-07321332_[redacted]_054343
Sequence Conservation Analyses of Nirmatrelvir Contact Residues in SARS-CoV-2 M^{pro}	SARS-CoV-2 M^{pro} Across SARS-CoV-2 Isolates and Other Coronaviruses	In Vitro	No	PWRDM[k]	PF-07321332_[redacted]_120222
Potency of Nirmatrelvir in CPE Assay in Human Rhabdomyosarcoma and HeLa Cells	Enterovirus 71 in Human Rhabdomyosarcoma and HRV1B in H1 HeLa cells	In Vitro	No	[redacted][b]	PF-07321332_[redacted]_041406
Potency of Nirmatrelvir and the Primary Oxidative Metabolite PF-07329268 (M4) in CPE Assay in VeroE6 Cells	SARS-CoV-2 in Monkey Kidney VeroE6 cells expressing ACE2 receptor[d]	In Vitro	No	[redacted][e]	PF-07321332_[redacted]_052017
Potency of Nirmatrelvir and in Combination with Ritonavir in a nanoluciferase reporter assay in A549 Cells	SARS-CoV-2 nanoluciferase reporter virus in a A549 Cell Line	In Vitro	No	[redacted]	PF-07321332_[redacted]_041209
Potency of Nirmatrelvir in CPE Assay in dNHBE cells	dNHBE cell cultures infected with SARS-CoV-2[d] with virus production assessed in Vero7E cells	In Vitro	No	[redacted][f]	PF-07321332_[redacted]_010204
Potency of Nirmatrelvir in CPE Assay in VeroE6 Cells	SARS-COV-1 in VeroE6 cells expressing ACE2 receptor	In Vitro	No	[redacted]	PF-07321332_[redacted]_104426

2.6.3.1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Nirmatrelvir

Type of Study	Species/Strain and/or Test System	Method of Administration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
Potency of Nirmatrelvir in CPE Assay in MRC-5 Cells	Human MRC-5 Cells infected with Human CoV-229E	In Vitro	No	[redacted][b]	PF-07321332_[redacted]_092314
Potency of Nirmatrelvir in CPE Assay in VERO81 Cells	MERS-CoV in Vero81	In Vitro	No	[redacted][e]	PF-07321332_[redacted]_015423
Efficacy of Nirmatrelvir Against Major SARS-CoV-2 Variants in VeroE6 P-gp Knockout or VeroE6 TMPRSS2 Cells	SARS-CoV-2 variants B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), P.1 (Gamma), B.1.617.2 (Delta), B1.1.1.37/C.37 (Lambda), B.1.621 (Mu), B.1.1.529 (Omicron BA.2)	In Vitro	No	PWRDM[k]	PF-07321332_[redacted]_104040
In Vitro qPCR-based Efficacy of Nirmatrelvir Against Major SARS-CoV-2 Variants in VeroE6 P-gp Knockout Cells	SARS-CoV-2 variants B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta- K90r and K90R+P252L), P.1 (Gamma), B.1.617.2 (Delta), B1.1.1.37/C.37 (Lambda), B.1.621 (Mu) and B.1.1.529 (Omicron BA.1)	In Vitro	No	PWRDM[k]	PF-07321332_[redacted]_042713
In Vitro Antiviral Potency of Nirmatrelvir Using an Immunostaining-Based Method with Concurrent Cytotoxicity Curves (MTT Assay) in HeLa-ACE2 and Vero-TMPRSS2 Cells	SARS-CoV-2 variants B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), B.1.617.2 (Delta), B.1.1.529 (Omicron)	In Vitro	No	[redacted][l]	PF-07321332_[redacted]_091706
In Vitro Activity of Nirmatrelvir Against Four Clinical Isolates of the Delta variant of human SARS-CoV-2 in Vero E6 TMPRSS2 Cells	CVD198, CVD202, CVD204, and CVD205 clinical isolates of SARS-CoV-2 Delta Variant and USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain	In Vitro	No	PWRDM[k]	PF-07321332_[redacted]_012142
Potency of Nirmatrelvir Against SARS-COV-2 3CL Protease Enzyme Containing Different Mutations	SARS-CoV-2 M^{pro}	In Vitro	No	PWRDM[j]	PF-07321332_[redacted]_121015

2.6.3.1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Nirmatrelvir

Type of Study	Species/Strain and/or Test System	Method of Administration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
Evaluation of Nirmatrelvir in Reverse Engineered Recombinant M^{pro} Mutant SARS-CoV-2 Viruses	VeroE6 cells	In Vitro	No	PWRDM[k]	PF-0721332_[redacted]_024518
Evaluation of In Vitro Selected Resistant MHV against Nirmatrelvir	MHV infected Murine L929 cells	In Vitro	No	PWRDM[k]	PF-07321332_[redacted]_035634
Evaluation of In Vitro Selected Resistant SARS-CoV-2 against Nirmatrelvir	VeroE6 P-gp knockout cells	In Vitro	No	PWRDM[k]	PF-07321332_[redacted]_113117
Evaluation of In Vitro Selected Resistant SARS-CoV-2 against Nirmatrelvir	A549-ACE2 cells	In Vitro	No	PWRDM[k]	PF-07321332_[redacted]_065112
Efficacy of Nirmatrelvir in Mouse-Adapted Disease Model	BALB/c Mouse-adapted SARS-CoV-2 Models	In Vivo	No	[redacted][f]	PF-07321332_[redacted]_105036
Efficacy of Nirmatrelvir as a Single Agent and in Combination with Ritonavir in Mouse-Adapted Disease Model	BALB/c Mouse-adapted SARS-CoV-2 Models	In Vivo	No	[redacted][f]	PF-07321332_[redacted]_092629
Efficacy of Nirmatrelvir in Mouse- Adapted Disease Model	129 Mouse SARS-CoV-2 Model	In Vivo	No	[redacted][i]	PF-0721332_[redacted]_022652
Secondary Pharmacodynamics					
CEREP broad ligand binding	Broad panel radioligand binding for s number of receptors, ion channels, and enzyme targets	In Vitro	No	[redacted][g]	100054569
PDE inhibition	PDE Subtypes 1-11	In Vitro	No	PWRDM	[redacted]LJ074
Cardiac Action Potential	CHO cells stably expressing Nav1.5 and Cav1.2	In Vitro	No	PWRDM	[redacted]LJ073
Safety Pharmacology					
Cardiovascular Assessment (hERG)	Mammalian cell (HEK293)	In Vitro	Yes	[redacted][h]	211129.[redacted]

2.6.3.1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Nirmatrelvir

Type of Study	Species/Strain and/or Test System	Method of Administration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
Cardiovascular Assessment (Aorta)	Rat isolated ascending aorta tissue	Ex Vivo	No	PWRDM	[redacted]LJ076
Cardiovascular Assessment (Heart)	Guinea pig isolated Langendorff-perfused heart	Ex Vivo	No	PWRDM	[redacted]LJ075
Neurofunctional and Pulmonary Function	Rat/Wistar Han	Oral Gavage	Yes	[redacted][i]	8455743
Cardiovascular	Monkey/Cynomolgus	Oral Gavage	Yes	PWRDM	[redacted]GR275

Pharmacodynamic Drug Interactions

None

M^{pro} = 3C-like protease; A549-ACE2 = A549 cells expressing the angiotensin-converting enzyme-2 receptor; ACE2 = angiotensin-converting enzyme-2; CHO = Chinese hamster ovary; CPE = cytopathic effect; CoV = coronavirus; CR-CLE = Charles River Laboratories Cleveland, Inc; dNHBE = differentiated normal human bronchial epithelial; FRET = fluorescence resonance energy transfer; GLP = Good Laboratory Practice; HCoV = human coronavirus; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go related gene; H1 HeLa = Henrietta Lacks cervical cancer H1 cell line; HIV = human immunodeficiency virus; HKU1 = human coronavirus HKU1; hRD = Human rhabdomyosarcoma; HRV1B = human rhinovirus 1B; MERS = Middle East respiratory syndrome-related coronavirus; MRC-5 = Medical Research Council cell strain 5, human diploid cell line derived from fetal lung tissue; PDE = phosphodiesterase; PWRDM = Pfizer Worldwide Research, Development & Medical; SARS = severe acute respiratory syndrome; VeroE6 = monkey kidney cells E6; Vero81 = African green monkey kidney cells.

a. Coronavirus panel consisted of beta-coronavirus SARS, MERS, and human 229E, NL63, OC43, and HKU1. Mammalian protease panel consisted of Cathepsin B, D, Caspase 2, bovine and human Chymotrypsin, Elastase, HIV-1, and Thrombin a
b. [redacted], China
c. [redacted], PA
d. SARS-CoV-2 (Washington; USA_WA1/2020) strain
e. [redacted], AL; Formerly [redacted].
f. [redacted], UT
g. [redacted], France
h. [redacted], OH
i. [redacted] NJ
j. Pfizer Inc. Groton, CT
k. Pfizer Inc, Pearl River, NY
l. New York, NY

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332 [redacted] 090608					
SARS-CoV-2 M^{pro} Protease Assay	Human coronavirus protease	In Vitro	Nirmatrelvir 30 - 0.0003 µM (11-point ½ log dilutions) or 1 - 0.001 µM (11-point, 2-fold dilutions)	N = 6	**Nirmatrelvir:** **IC_{50} µM (95% CI)** SARS-CoV-2 = 0.0192 (0.0135 - 0.025) **Ki µM (95% CI)** SARS-CoV-2 = 0.00311 (0.00131 - 0.00491)
			PF-07329268 (M4) 1 - 0.001 µM (11-point, 2-fold dilutions)	N = 2	**PF-07329268 (M4; primary oxidative metabolite)** **IC_{50} µM (95% CI)** SARS-CoV-2 = 0.0175 (0.0153, 0.0200)[b] **Ki µM (95% CI)** SARS-CoV-2 = 0.00315 (0.00236, 0.00422)[b]
PF-07321332 [redacted] 091415					
Potency Against Mammalian and Viral Protease Panels	Human Alpha and Beta coronavirus, and Mammalian and Viral Proteases	In Vitro	Coronavirus Panel 30 - 0.0003 µM (11-point ½ log dilutions)	N = 3	**Nirmatrelvir IC_{50} µM (95% CI)** SARS-CoV-1 = 0.0289 (0.0244, 0.0342)
			Protease Panel 100 - 0.0152 µM (9-point 3-fold dilutions)	N = 3 N = 3	**Alpha coronaviruses:** NL63 = 0.479 (0.242 - 0.949) HCoV-229E = 0.113 (0.0417 - 0.304)
			Human Chymotrypsin: 10 - 0.0001 µM (11-point ½ log dilutions)	N = 3 N = 3 N = 3	**Beta coronaviruses:** MERS = 0.402 (0.218 - 0.741) HKU1 = 0.0391 (0.0256 - 0.0598) OC43 = 0.0777 (0.0312 - 0.194)
			Human Cathepsin B 100 - 0.001 µM (11-point ½ log dilutions)	N = 3 N = 3 N = 2	**Nirmatrelvir IC_{50} µM** Cathepsin B (Human) >100 Cathepsin L (Human) >100 Chymotrypsin (Human) >10
			Human Cathepsin L 100 - 0.0051 µM (10-point 3-fold dilutions)	N = 2 N = 2 N = 2 N = 2 N = 2 N = 2	Chymotrypsin (Bovine) >100 Thrombin (Human) >100 Caspase 2 (Human) >100 Cathepsin D (Human) >100 HIV-1 (Human) >100 Elastase (Human) >100

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332 [redacted] 054343					
X-ray Co-Crystal Structure of Nirmatrelvir Bound to SARS-CoV-2 M^{pro}	SARS-CoV-2	In Vitro	NA	NA	Nirmatrelvir bound to the active site SARS-CoV-2 M^{pro} and formed a covalent interaction between the substrate site of the main protease and nirmatrelvir, with a 1.90 Å C-S bond length, as determined by the co-crystal structure.
PF-07321332 [redacted] 120222					
Sequence Conservation Analyses of Nirmatrelvir Contact Residues in SARS-CoV-2 M^{pro}	SARS-CoV-2 M^{pro} Across SARS-CoV-2 Isolates and Other Coronaviruses	In Vitro	NA	NA	The 15 contact residues were highly conserved, with frequency of mutation <0.017% in the circulating clinical isolates in GISAID database at the time of analysis (30Apr2022). M^{pro} active site residues were conserved across all human coronaviruses and across the Coronaviridae family MHV and SARS-CoV-2 M^{pro} sequences shows ~ 51% homology. SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 M^{pro} sequences are highly conserved (90% identical).
PF-07321332 [redacted] 041406					
Enterovirus 71 in Human Rhabdomyosarcoma and HRV1B in H1 HeLa cells, CPE, and Cytotoxicity Assays	Enterovirus 71 and HRV1B	In Vitro	100 - 0.03 µM (8-point ½ log dilutions)	N=2; N=2 N=2; N=2	**Nirmatrelvir (µM)** HRV1B in HeLa Cells: Geometric mean EC_{50} = >100; CC_{50} = >100 EV71 in hRD cells: Geometric mean EC_{50} = >100; CC_{50} = >100

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332_[redacted]_052017					
SARS-CoV-2 in VeroE6 Cell Line enriched for ACE2 in CPE Assay	Monkey and SARS-CoV-2 [Washington; (USA_WA1/ 2020 strain)]	In Vitro	Nirmatrelvir 100 - 0.003 µM or 10 - 0.0003 µM (10-point ½ log dilutions) PF-07329268 (M4) 3.33 - 0.0001 µM or 3 - 0.0001 µM (10-point ½ log dilutions) CP-100356 (P-gp inhibitor) 2.0 µM	N = 20 N = 20 N = 10 NA N = 20 N = 20 N = 10 NA N = 4 N = 4 N = 2 NA N = 3 N = 3 N = 2 NA	**Nirmatrelvir (µM)[c]** EC_{50} (95% CI) = 4.48 (3.55-5.65) EC_{90} (95% CI) = 9.46 (7.60-11.8) CC_{50} (95% CI) >100 or >10 (ND) TI[d] >21.5 **Nirmatrelvir + CP-100356 (µM)[c, e]** EC_{50} (95% CI) = 0.0745 (0.0665-0.0834) EC_{90} (95% CI) = 0.155 (0.138-0.173) CC_{50} (95% CI) >100 or >10 (ND) TI[d] >1250 **PF-07329268 (M4) (µM)[c]** EC_{50} (95% CI) >3.33 or >3 (ND) EC_{90} (95% CI) >3.33 or >3 (ND) CC_{50} (95% CI) >3.33 or >3 (ND) TI[d] = ND **PF-07329268 (M4) + CP-100356 (µM)[c, e]** EC_{50} (95% CI) = 0.690 (0.210 – 2.27) EC_{90} (95% CI) = 1.44 (0.437 – 4.72) CC_{50} (95% CI) >3.33 or >3 (ND) TI[d] >5.08

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332_[redacted]_041209					
Potency in SARS-CoV-2 in a A549 Cell Line, Alone and in Combination with Ritonavir	SARS CoV-2	In Vitro	Single agent study Nirmatrelvir: 3 - 0.0001 µM (10-point ½ log dilutions) Combination Study Nirmatrelvir: 3 - 0.015 µM (14-point 1.5 dilutions) Ritonavir: 3 - 0.180 µM (8-point 1.5 dilutions)	N=28 N=28 N=14 N=2 N=2 N=1	**Nirmatrelvir (µM)[c]** EC_{50} (95% CI) = 0.0779 (0.0505 to 0.120) EC_{90} (95% CI) = 0.215 (0.146 to 0.317) CC_{50} (95% CI) >3 (ND) **Ritonavir (µM)[c,e]** EC_{50} (95% CI) = >3 (ND) EC_{90} (95% CI) = >3 (ND) CC_{50} (95% CI) >3 (ND) Ritonavir had no effect on viral replication in A549-ACE2 cells up to the highest concentration tested (3 µM)
PF-07321332_[redacted]_010204					
SARS-CoV-2 in dNHBE Cells, Virus Production Assessed in a CPE Assay in Vero76 Cells	Human and SARS-CoV-2 Washington (USA_WA1/ 2020 strain)	In Vitro	Nirmatrelvir 10, 0.5, 0.1, 0.01 µM 0.5, 0.1, 0.03, 0.01 µM (4-point, EC_{50} curves) 5, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, and 0.016 µM (8-point, EC_{50} curves) Remdesivir 1 - 0.001 µM (4-point, full-log dilutions)	N = 1 N = 2 N = 3	**Nirmatrelvir (µM) Day 3 and Day 5[c,f]** EC_{50} = 0.0618 and 0.0326 EC_{90} = 0.181 and 0.0561 **Remdesivir (µM) Day 3 and Day 5[c,f]** EC_{50} = 0.00297 and 0.0545 EC_{90} = 0.00111 and 0.0156

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332_[redacted]_104426					
Potency in SARS COV-1 in VeroE6	SARS COV-1	In Vitro	Nirmatrelvir 100 - 0.003 µM (10-point ½ log dilutions) CP-100356 (P-gp inhibitor) 2 µM (single dose)	N = 12 N = 12 N = 6 N = 12 N = 12 N = 6	**Nirmatrelvir (µM)[c]** EC_{50} (95% CI) = 12.3 (8.95-16.8) EC_{90} (95% CI) = 25.5 (18.6-35.0) CC_{50} (95% CI) >100 (ND) TI[d] >8.95 **Nirmatrelvir (µM)[c,e] + CP-100356 at 2 µM** EC_{50} (95% CI) = 0.151 (0.108-0.212) EC_{90} (95% CI) = 0.317 (0.225-0.446) CC_{50} (95% CI) >100 (ND) TI[d] >756
PF-07321332_[redacted]_092314					
HCoV-229E in MRC-5 Cells in CPE Assay	Human, 229E strain	In Vitro	CPE assay: 3 - 0.00095 µM (8-point ½ log dilutions) CC_{50} 100 - 0.03 µM (8-point ½ log dilutions)	N = 3 N = 3 N = 3	**Nirmatrelvir (µM)[c]** EC_{50} (95% CI) = 0.190 (0.0583, 0.621) EC_{90} (95% CI) = 0.620 (0.166, 2.32) CC_{50} (95% CI) >100 (ND) TI[d] >567
PF-07321332_[redacted]_015423					
MERS-CoV in Vero81 Cell Line in CPE Assay	MERS-CoV	In Vitro	Nirmatrelvir 100 - 0.003 µM (10-point ½ log dilutions) CP-100356 (P-gp inhibitor) 1.0 µM (single dose)	N=16 N=16 N=8 N=16 N=16 N=8	**Nirmatrelvir (µM)[c]** EC_{50} (95% CI) = 5.41 (4.92 to 5.94) EC_{90} (95% CI) = 11.6 (10.1 to 13.3) CC_{50} (95% CI) >100 (ND) TI[d] >18.7 **Nirmatrelvir (µM)[c,e] + CP-100356 at 1 µM** EC_{50} (95% CI) = 0.166 (0.145 to 0.191) EC_{90} (95% CI) = 0.351 (0.301 to 0.409) CC_{50} (95% CI) >100 (ND) TI[d] >623

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332_[redacted]_104040					
Susceptibility of Nirmatrelvir Against Major SARS-CoV-2 Variants in VeroE6 Cells Using a CPE [redacted] Luminescent Cell-based Assay	USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain and Alpha, Beta, Gamma, Lambda, Delta and Mu variants in VeroE6 P-gp knockout and VeroE6 TMPRSS2 cells	In Vitro	Nirmatrelvir VeroE6 P-gp knockout cells: 21.33 nM - 1.25 µM (10-point dilution) VeroE6 TMPRSS2 cells: 750 nM - 19.5 nM (10-point, 1.5-fold dilution) Remdesivir: 750 nM - 1.46 nM (10-point 2-fold dilution) CP-100356 (P-gp inhibitor) 2 µM	N=6 for USA-WA1/2020 strain and N=3 for the Alpha, Beta, Gamma, Lambda, Delta, and Mu variants.	**Geometric mean nirmatrelvir EC_{50} values in VeroE6 P-gp knockout cells:** 108 nM (USA-WA1), 75.3 nM (Alpha), 171 nM (Beta- K90R+P252L), 87.7 nM (Gamma), 59.5 nM (Lambda), and 65.1 nM (Mu) in the USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain. The geometric mean EC_{50} values of remdesivir (an assay control) were in the range of 21.1 to 72.7 nM for these variants. **Geometric mean nirmatrelvir EC_{50} values in VeroE6 TMPRSS2 cells + P-gp inhibitor:** 92.8 nM (USA-WA1), 170 nM (Alpha), 217 nM (Beta- K90R+P252L), 204 nM (Gamma), 93.0 nM (Lambda), 82.2 nM (Delta),138 nM (Mu), 79[g] (Omicron BA.2) in the USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain. The geometric mean EC_{50} values of remdesivir (an assay control) were in the range of 79.8 to 169 nM for these variants.
PF-07321332_[redacted]_042713					
In Vitro qPCR-based Efficacy of Nirmatrelvir Against Major SARS-CoV-2 Variants in VeroE6 Pgp Knockout Cells	USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain and Alpha, Beta, Gamma, Lambda, Delta, Mu and Omicron variants in VeroE6 P-gp knockout cells	In vitro	Nirmatrelvir: 2-fold, 10-point serial dilution starting at 1.25 µM Remdesivir: 2-fold, 10-point serial dilution starting at 250 nM	N=8 for USA-WA1/2020 strain and N=3 or 4 for the Alpha, Beta, Lambda, Gamma, Delta, Mu and Omicron variants	**Geometric mean nirmatrelvir EC_{50} values in VeroE6 P-gp knockout cells:** 38.0 nM (USA-WA1), 41.0 nM (Alpha), 127.2 nM (Beta; K90R+P252L), 24.9 nM (Gamma), 15.9 nM (Delta), 21.2 nM (Lambda), 25.7 nM (Mu) and 16.2 nM (Omicron BA.1), 141 nM (Beta K90R) in the USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain. The geometric mean EC_{50} values of remdesivir (assay control) were in the range of 1.9 to 25.5 nM, for these variants.

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332 [redacted] 091706					
In vitro antiviral potency using an immunostaining-based method with concurrent cytotoxicity curves (MTT Assay)	USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain and Alpha, Beta, Delta, and Omicron variants in HeLa-ACE2 and Vero TMPRSS2 cells	In vitro	Nirmatrelvir (concentrations not provided) CP-100356 (P-gp inhibitor) 2 µM	N=2 HeLa-ACE2 cells and N=1 Vero TMPRSS2 cells	**Geometric mean nirmatrelvir IC_{50} values in HeLa-ACE2 cells:** 207 nM (USA-WA1), 118 nM (Alpha B.1.1.7), 225 nM (Beta B.1.351), 169 nM (Delta B.1.617.2), and 70 nM (Omicron B.1.1.529) in the USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain. **Nirmatrelvir IC_{50} values in Vero TMPRSS2 cells + P-gp inhibitor:** 38 nM (USA-WA1), 22 nM (Alpha B.1.1.7), 121 nM (Beta B.1.351), 73 nM (Delta B.1.617.2), and 23 nM (Omicron B.1.1.529) in the USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain.
PF-07321332 [redacted] 012142					
In Vitro Activity Against Four Clinical Isolates of the Delta variant of human SARS-CoV-2	CVD198, CVD202, CVD204, and CVD205 clinical isolates of SARS-CoV-2 Delta Variants and USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain in VeroE6 TMPRSS2 cells	In vitro	Nirmatrelvir (750 - 19.5 nM) 10-point dilution, with the first two and last two dilutions at 2-fold and the remaining intermediate dilutions at 1.5-fold dilutions Remdesivir (750 - 1.46 nM) 2-fold, 10-point dilution CP-100356 (P-gp inhibitor) 2 µM	Geomean EC_{50} or EC_{90} of the isolate (n=4) to the USA-WA1/2020 determined in experiment 1 (n=3)	**Geometric mean nirmatrelvir EC_{50} values in VeroE6 TMPRSS2 cells + P-gp inhibitor:** 103.2 nM (USA-WA1), 221.1 nM (CVD198), 157.4 nM (CVD202), 147.9 nM (CVD204), and 111.2 nM (CVD205) in the USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain. **Geometric mean nirmatrelvir EC_{90} values in VeroE6 TMPRSS2 cells + P-gp inhibitor:** 215.5 nM (USA-WA1), 461.8 nM (CVD198),), 331.7 nM (CVD202), 308.5 nM (CVD204), and 232.7 nM (CVD205) in the USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 strain. The geometric mean EC_{50} and EC_{90} values of remdesivir (assay control + P-gp inhibitor) were in the range of 185.5 to 262.9 nM, and 394.7 to 556.1 nM, respectively

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332_[redacted]_121015					
Potency of Nirmatrelvir Against SARS-COV-2 Main Protease Enzyme Containing Different Mutations	SARS-COV-2 Main Protease Mutant Enzymes; and wild type = SARS-CoV-2 Washington USA_WA1/ 2020 M^{pro}	In Vitro	Nirmatrelvir 10 - 0.00122 µM (14-point 1:2 dilutions) Or 1 - 0.00693 µM (14-point 1:1.75 dilutions)	n ≥ 3 / Enzyme mutation tested	Of all mutations tested, 15 mutant M^{pro} displayed a >5-fold decrease in potency (Ki) vs WT in the presence of nirmatrelvir and a decrease in catalytic efficiency vs WT (Y54A, F140A, F140L, S144A, S144E S144T, S144A & E55L, H164N, E166A, E166G, H172Y, A173V, V186G, Q189K, Q192L, Q192P) which would be predicted to affect the ability of the virus to replicate. Two mutations were identified in the in vitro selected resistant MHV, S144A and the double mutation S144A+E55L with demonstrated nirmatrelvir potencies (Ki) of 85.7 and 94.2 nM, respectively. S144A and E55L showed EC_{50}-fold (x) changes compared to WT of 2.5x and 1.8x, respectively in the RT-qPCR antiviral assay, which was below the median clinical concentration and indicates similar susceptibility to nirmatrelvir as WT. Three additional mutations at S144 (E, T), and A173V also showed a decrease in potency with Ki values of 438, 151, and 24.5 nM, respectively. In the RT-qPCR assay, the A173V mutation showed a 0.9-fold reduction in EC_{50} vs WT. The G15S, T45I, P108S, T135I, A234V, and D248E M^{pro} mutations, found naturally occurring in the population, had Ki changes that were less than 5-fold. An additional two mutations (A260V and A260T) were identified in the EPIC HR clinical trial. These are natural polymorphisms in publicly available SARS-CoV-2 GISAID sequences found at low frequency (<0.2%). The A260V M^{pro} substitution did not reduce nirmatrelvir potency (Ki <1-fold) therefore, it is expected that strains with this mutation would not have reduced nirmatrelvir activity. The clinical significance of the evaluated M^{pro} polymorphisms is unknown, and it is also unknown if results from the biochemical assay are predictive of antiviral activity in cell culture.

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332_[redacted]_024518					
Reverse engineered recombinant SARS-CoV-2 against Nirmatrelvir and characterization of viral fitness and resistance in VeroE6 cells	Recombinant SARS-CoV-2	In vitro	VeroE6 P-gp knockout cells were seeded into 96-well plates ($2x10^4$ cells/well) and infected with the parent or mutant virus at an MOI of 0.041	N≥3 (number of EC_{50} values used to determine geomean)	Mutations in MHV and SARS-CoV-2 M^{pro} identified from in vitro selection, or those which affected M^{pro} activity, were reverse engineered into SARS-CoV-2 and evaluated for reduced viral fitness and phenotypic antiviral activity. Ten recombinant SARS-CoV-2 viruses containing individual M^{pro} gene mutations each including G15S, E55L, L89F, K90R, P132H, S144A, E55L+S144A, E166A, Q189K, and H164N were successfully generated. Generation of recombinant viruses containing Y54A, F140A, S144E, S144L, S144P, S144T, E166V, and H172Y was unsuccessful, consistent with the possible lethality of these mutations to virus replication. Nine of the recombinant mutants were evaluated for nirmatrelvir antiviral activities and showed the following EC_{50}-fold (x) change compared to WT: G15S (0.7x), E55L (1.8x), L89F (1.3x), K90R (1.5x), P132H (0.5x), S144A (2.5x) E166A (3.3x), Q189K (0.2x), H164N (1.9x). For the S144A and E166A SARS CoV-2 mutants, a 2.5x and 3.3x EC_{50}-fold compared to WT was observed, respectively. An EC_{50} shift of less than 10-fold is below the median clinical exposure and predicted to be susceptible to nirmatrelvir. All 9 tested mutant viruses remained sensitive to remdesivir.

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332 [redacted] 035634					
Evaluation of In Vitro Selected Resistant MHV against Nirmatrelvir	Mouse Hepatitis Virus infected Murine L929 cells	In vitro	Serial passaged with Nirmatrelvir gradually increasing concentrations beginning at 0.5x EC_{50} and up to 30x (25.4 µM), 40x (33.9 µM), 50x (42.34 µM) EC_{50} Total of 11 passages	N=4 (number of EC_{50} values used to determine geomean)	Treatment with Nirmatrelvir up to 30x (25.4 µM) and 40x (33.9 µM) EC_{50} concentrations led to selection of P55L and S144A mutations in M^{pro} as well as three lower frequency mutations (T129M, T50K, and P15A) in M^{pro} gene (frequency <4.6%). The tested mutant viruses showed 1 to 2 log10 PFU/mL reduced replication efficiencies as compared to that of the parent MHV. Nirmatrelvir remained active against these mutant MHV with 4.4- to 4.9-fold higher EC_{50} values compared to parent MHV. CPE was not detected at 50xEC_{50} (42.34 µM, passage 11) and RT-qPCR analysis confirmed no replicating virus present indicating susceptibility to the 50xEC_{50} concentration.
PF-07321332 [redacted] 113117					
Evaluation of In Vitro Selected Resistant SARS-CoV-2 against Nirmatrelvir	VeroE6 P-gp knockout cells	In Vitro	Serial passaged with nirmatrelvir starting at 1xEC_{50} and 1xEC_{90}. Initial passage at MOI=0.01 and MOI=~0.001 thereafter. From the initial two passages, several approaches were carried out which resulted in 5 lineages by applying constant concentration of nirmatrelvir for 9 passages or gradually increasing concentrations of nirmatrelvir. Total of 9 passage	N≥3	For SARS-CoV-2 cell culture nirmatrelvir resistance selection in VeroE6 P-gp knockout cells, the starting nirmatrelvir concentration was 1xEC_{50} and then slowly increased at subsequent passages in order to amplify the resistant mutant viruses. At each passage of infected cells, the isolated virus culture was subjected to deep sequencing analysis and new cells were infected. From five different lineages and up to 9 passages, the following M^{pro} mutations were detected and tested in the RT-qPCR based antiviral assay to measure susceptibility to nirmatrelvir with EC_{50} fold (x) increases relative to WT: T304I (3.4x), T21I+T304I (7.9x), L50F+T304I (5.9x), T135I+T304I (3.8x), T304I+A173V (20x), and T21I+T304I+S144A (28x).

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332 [redacted] 113117 (Continued)					
Evaluation of In Vitro Selected Resistant SARS-CoV-2 against Nirmatrelvir	VeroE6 P-gp knockout cells	In Vitro	Serial passaged with nirmatrelvir starting at 1xEC_{50} and 1xEC_{90}. Initial passage at MOI=0.01 and MOI=~0.001 thereafter. From the initial two passages, several approaches were carried out which resulted in 5 lineages by applying constant concentration of nirmatrelvir for 9 passages or gradually increasing concentrations of nirmatrelvir. Total of 9 passage	N≥3	The T304I mutation appeared first, followed by appearance of the other mutations in combination as nirmatrelvir concentration increased during subsequent passaging.The T304I mutation alone reduced susceptibility by 3.4-fold EC_{50} over WT WA SARS-CoV-2. The addition of T135I, resulting in the T304I+T135I virus, showed a similar 3.8-fold EC_{50} change reduced susceptibility. Addition of L50F or T21I in combination with T304I, resulting in T304I+L50F and T304I+T21I viruses, further increased the fold EC_{50} over WT by 5.9-fold and 7.9-fold, respectively. Although the S144A mutation alone results in 2.5-fold increase in EC_{50}, addition of the S144A mutation to the T304I+T21I virus further reduced nirmatrelvir susceptibility of the T304I+T21I+S144A virus by ~28-fold EC_{50} over WT. In addition, the combination of A173V mutation with T304I resulted in the T304I+A173V virus with a reduced susceptibility of ~20-fold EC_{50} over WT. The double mutant T304I+A173V and triple mutant T21I+T304I+S144A demonstrated most reduced susceptibility to nirmatrelvir with fold-changes of ~20- and 28-fold increase in EC_{50} to that of WT which is >14.5-fold the median clinical concentration of nirmatrelvir. All of the nirmatrelvir mutant viruses isolated by drug selection in VeroE6 cells remained susceptible to remdesivir and replicated well, indicating that the M^{pro} mutations did not affect inhibition by remdesivir or viral fitness. Control SARS-CoV-2 USA-WA1 passaged in 0.3% DMSO had no mutations identified in M^{pro} through Passage #10.

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332 [redacted] 065112					
Evaluation of In Vitro Selected Resistant SARS-CoV-2 against Nirmatrelvir	Passaging in A549-ACE2 cells, RT-qPCR in VeroE6 TMPRSS2 cells	In Vitro	Passaged 7 times under increasing concentrations of nirmatrelvir starting at 6xEC_{50} (0.3 µM) up to a concentration of 40x or 50x EC_{50} (2 or 2.5 µM)	N=3 for RT-qPCR EC_{50} assay in VeroE6 TMPRSS2 cells in presence of 2 µM P-gp in hibitor (nirmatrelvir or remdesivir)	Nirmatrelvir resistance selection studies were conducted in A549-ACE2 cells to determine whether the selected mutations could confer reduction in viral fitness or decreased susceptibility to nirmatrelvir in comparison to the WT (SARS-CoV-2 USA-WA1) strain. Treatment of SARS-CoV-2 infected A549-ACE2 cells with increasing concentrations of nirmatrelvir starting at 6xEC_{50}, led to the selection of two mutations (A173V and A173V+F140L) in M^{pro} with high frequency in passages at the 25x, 40x, and 50xEC_{50} concentrations. The A173V mutant virus was present at passages 3, 4, and 5 and the A173V+F140L mutant virus was present at passages 6 and 7. The A173V+F140L virus showed markedly reduced viral fitness as indicated by ~2log reduction in virus titer as well as both mutants showed smaller plaque size compared to the parent virus in A549-ACE2 cells. Because the mutant viruses were growth impaired in the A549-ACE2 cells, VeroE6 TMPRSS2 cells were used for the RT-qPCR antiviral assay in the presence of nirmatrelvir and 2 µM of a P-gp inhibitor. EC_{50} values for the SARS-CoV-2 USA-WA1 strain and the A173V mutant virus were similar while the double mutant, A173V+F140L demonstrated reduced nirmatrelvir susceptibility of 10-fold the EC_{50} compared to WT, which is below the median clinical exposure and would be predicted to be susceptible to nirmatrelvir. Both the A173V and A173V+F140L mutant viruses remained susceptible to remdesivir.

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-07321332_[redacted]_105036					
Efficacy Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Model	BALB/c Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Model	In Vivo	Mice were dosed PO (as two independent studies) 4 hours post infection with nirmatrelvir at 300 or 1000 mg/kg BID or with vehicle starting on Day 0 post infection	Study 1 N=6/ and N=2/ treatment for PK Study 2 N=6/and N=3/ treatment for PK combined: N=12	Study 1 and 2 combined: Compared to vehicle, nirmatrelvir at doses of 300 ($p < 0.01$) or 1000 ($p < 0.001$) mg/kg protected mice from weight loss after infection and significantly reduced lung virus titers by approximately 1.39 $\log_{10}$ ($p < 0.0001$) or 1.91 $\log_{10}$ ($p = 0.002$), respectively. Doses of 300 mg/kg or 1000 mg/kg also ameliorated indicators of disease via lung histopathology. Nirmatrelvir has antiviral efficacy in the mouse-adapted model of SARS-CoV-2 with the data supporting efficacy when maintaining ~1xEC_{90} at C_{min} (the in vitro anti-SARS-CoV-2 EC_{90} of ~181 nM[g]).
PF-07321332 [redacted] 092629					
In Vivo Efficacy of Nirmatrelvir as a Single Agent or in Combination with Ritonavir Mouse-adapted SARS-CoV-2 Model	BALB/c Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Model	In Vivo	Mice were dosed PO (as two independent studies) 4 hours post infection with nirmatrelvir at 300 mg/kg BID with and without ritonavir at 50 mg/kg BID, or with vehicle starting on Day 0 post infection	Study 2: N=6/treatment and N=2 for PK Study 3: N=6/treatment and N=2 treatment for PK Study 2 and 3 combined: N=12; study 1 could not be interpreted due to contamination and gaps in documentation	Study 2 and 3 combined: Compared to placebo, nirmatrelvir at doses of 300 mg/kg BID or in combination with ritonavir (50 mg/kg BID) reduced lung virus titers by approximately 1.2 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/mL ($p < 0.0005$) or 1.6 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/mL ($p < 0.0001$) compared to placebo treated group, respectively. Importantly, Ritonavir at 50 mg/kg BID did not affect lung virus titer, suggesting it does not have in vivo anti-SARS-CoV-2 activity. Histopathological analysis of lungs (study 2) from mice treated with nirmatrelvir and ritonavir protected lung tissue from damage due to virus replication. Nirmatrelvir has antiviral efficacy in the mouse-adapted model of SARS-CoV-2 with the data supporting efficacy when maintaining ~1xEC_{90} at C_{min} (the in vitro anti-SARS-CoV-2 EC_{90} of ~181 nM[g]).

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N Replicate/ Group	Noteworthy Findings[a]
PF-0721332_[redacted]_022652					
Efficacy in Mouse SARS-CoV-2 Model	129 Mouse SARS-CoV-2 Model	In Vivo	Mice dosed PO at 300 mg/kg or 1000 mg/kg BID with nirmatrelvir beginning 4 hours PI or 1000 mg/kg BID beginning 12 hours PI	N=6/treatment and N=2/ treatment for exposure	A nirmatrelvir dose of 300 mg/kg BID reduced lung viral titers when compared to vehicle controls (1.1 $\log_{10}$), and improved indicators of disease (weight loss). Treatment with nirmatrelvir at 1000 mg/kg dosed at 4 or 12 hours post infection significantly reduced lung virus titers by approximately 4 $\log_{10}$ ($p < 0.001$) compared to vehicle treated group.

Studies listed above are not GLP compliant.
ACE2 = angiotensin converting enzyme 2; A549-ACE2 = A549 cells expressing the angiotensin-converting enzyme-2 receptor; BID = twice daily; CC_{50} = concentration required for 50% cytotoxicity; CI = confidence interval; C_{min} = minimum observed drug concentration or exposure; CoV = coronavirus; CPE = cytopathic effect; dNHBE = differentiated normal human bronchial epithelial; EC_{50} = concentration at which 50% inhibition of viral replication is observed; EC_{90} = concentration at which 90% inhibition of viral replication is observed; EV71 = Enterovirus 71; GLP = Good Laboratory Practice; GISAID = Global Initiative on Sharing All Influenza Data; HCoV = human coronavirus; HCoV 229E = human coronavirus 229E; H1 HeLa = Henrietta Lacks cervical cancer H1 cell line; HIV = human immunodeficiency virus; HKU1 = human coronavirus HKU1; hRD = Human rhabdomyosarcoma; HRV1B = human rhinovirus 1B; IC_{50} = 50% inhibitive concentration; Ki = inhibition constant; M^{pro}= Main protease; MERS = Middle East respiratory syndrome; MRC-5 = Medical Research Council cell strain 5, human diploid cell line derived from fetal lung tissue; N or n = number of replicates; NA = not available or not applicable; ND = not determined; NL63 = human coronavirus NL63; OC43 = human coronavirus OC43; P-gp = p-glycoprotein; PI = post-infection: PK = pharmacokinetic; PO = per os; SARS = severe acute respiratory syndrome; TI = therapeutic index; VeroE6 = monkey kidney cells E6; Vero81 = African green monkey kidney cells; WT = Wildtype.
a. Geometric Mean values are reported unless otherwise noted.
b. When n = 2, the range of the values are reported instead of the CI
c. EC_{50} curves were fit to a Hill slope of 3 when >3 and defined by top dose, when ≥50%. When cytotoxicity was detected at >30% effect, corresponding concentration data was eliminated from the determination of EC_{50}.
d. Individual TI values were calculated by dividing the CC_{50} by the EC_{50} values and then averaged for a cumulative TI.
e. CP-100356 is a P-gp inhibitor tested at a concentration of 2.0 µM.
f. EC_{50} values represent the arithmetic mean.
g. The EC_{50} value for SARS-CoV-2 USA-WA1 was 130 nM (n=4) for the Omicron BA.2 assay in VeroE6 TMPRSS cells using CTG assay.

2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Nirmatrelvir

Type of Study	Test System	Method of Administration	Concentration	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
CEREP Broad Ligand Binding	Broad panel of receptors, ion channels, transporters and enzymes (82 targets in total)	In Vitro	100 µM	No effect >50%. Results showing an inhibition or stimulation for assays run in basal conditions >50% are considered meaningful effects of the test compounds.	No	100054569
Activity of PF-07321332 at PDE Subtypes	PDE subtypes 1 to 11	In Vitro	0.0001-200 µM	All PDE subtypes IC_{50} >200 µM	No	[redacted]LJ074
Cardiac Action Potential	CHO cells expressing Nav1.5 sodium channels and Cav1.2 calcium channels	In Vitro	0.003, 0.03, 0.3, 3, 30, 300 µM	IC_{50} >300 µM	No	[redacted]LJ073

CHO = Chinese hamster ovary; GLP = Good Laboratory Practice; IC_{50} = 50% inhibitive concentration; PDE = phosphodiesterase.

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Nirmatrelvir

In Vitro

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Concentration (µM)	Results	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
Cardiovascular Assessment (hERG)	HEK 293 cells expressing hERG potassium channels	30, 300	12.6%* inhibition of hERG at 300 µM; IC_{50} >300 µM.	Yes	211129.[redacted] ([redacted]LJ022)
Cardiovascular Assessment (Heart)	Guinea pig isolated Langendorff-perfused heart	0.03-100	No statistically significant effects on cardiac functional or conduction parameters at any concentration tested.	No	[redacted]LJ075
Cardiovascular Assessment (Aorta)	Rat isolated ascending aorta tissue	0.000002-100	PF-07321332 produced a statistically significant concentration-dependent vasorelaxation when compared to solvent control values at 33.3 and 100 µM (57.3 ± 5.7% and 38.3 ± 5.6% of KCl control values respectively). IC_{50} = 50.3 µM PF-07321332 did not produce vasoconstriction at any concentration.	No	[redacted]LJ076

*p <0.05, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison.
GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene; IC_{50} = 50% inhibitive concentration; KCl = potassium chloride.

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY — Test Article: Nirmatrelvir

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain/ Model	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
Pulmonary RR, TV, MV	Rat/Wistar Han	Oral gavage, 10 mL/kg (2% Polysorbate 80 in 0.5% [w/v] methylcellulose in purified water) Lot [redacted]	0, 0 (150 MTBE)[b], 60, 1000	6M	**0 (MTBE)[b] and 60 mg/kg**: None **1000 mg/kg**: ↑ RR (up to +44%); ↑ MV (up to +38%)	Yes	8455743 ([redacted]GR274)
Central Nervous System FOB, BT, LA				6M	**0 (MTBE)[b] and 60 mg/kg**: None **1000 mg/kg**: ↑ Horizontal movement counts (up to 298%) during the second 30-minute period; ↑ vertical movement counts (up to 838%) during the second 30-minute period; ↓ vertical movement counts (-36%) during the first 5-minute period.		

BT = body temperature; FOB = functional observational battery; GLP = Good Laboratory Practice; LA = locomotor activity; M = male; MTBE = methyl tert-butyl ether; MV = minute volume; RR = respiratory rate; TV = tidal volume.
a. Single dose unless specified otherwise.
b. The MTBE control consisted of 15 mg/mL MTBE in 2% (v/v) Polysorbate 80 in 0.5% (w/v) methylcellulose in purified water. The amount of MTBE in the control was based on the amount of MTBE present in the high dose group (15% MTBE).

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Nirmatrelvir

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain/ Model	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
Cardiovascular[b] ECG: RR-I, PR-I, QRS-I, QT-I, QTc, HR Systemic Arterial BP: SBP, DBP, MBP LVP: LV-SP, LV-EDP, LV + dP/dt max	Monkey/ Cynomolgus ambulatory telemetry	Oral gavage, 5 mL/kg (2% (v/v) Polysorbate 80 in 0.5% (w/v) methylcellulose in purified water) Lot [redacted]	0, 0 (22.5 [11.5 BID] MTBE)[c], 40 (20 BID), 150 (75 BID)	8M	**0 (MTBE)[c] and 40 (20 BID) mg/kg:** None **150 (75 BID) mg/kg**: ↑ RR-I (+37-52 msec), ↑ PR-I (+3 msec), ↑ QT-I (+11-13 msec), ↓ QTc (-5 to -7 msec), ↓ HR (-8 to -14 bpm) ↑ SBP (+4 mmHg), ↑ DBP (+3-5 mmHg), ↑ MBP (+5 mmHg) ↓ LV+dP/dt max (-306 to -364 mmHg/sec)	Yes	[redacted]GR275

Cardiovascular Study ([redacted]GR275) Pharmacokinetic Parameters:

Dose (mg/kg)	0	MTBE	40 (20 BID)	150 (75 BID)	150 (75 BID)[d]
PF-07321332 – Parent					
C_{max} (µg/mL)	NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	14.7 (± 9.24)
AUC_{24} (µg•h/mL)	NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	131 (± 100)
T_{max} (h)	NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[g]
Plasma Concentration (µg/mL) (6 hours postdose)	NA[f]	NA[f]	0.0334 (± 0.0235)	0.308 (± 0.226)	0.178 (± 0.133)

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY — Test Article: Nirmatrelvir

AUC_{24} = area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours; BID = twice daily; BP = blood pressure; BT = body temperature; C_{max} = maximum observed concentration; DBP = diastolic BP; ECG = electrocardiogram; GLP = Good Laboratory Practice; HR = heart rate; LV + dP/dT max = the maximum rate of rise in left ventricular pressure (index of myocardial contractility); LV-EDP = left ventricular end diastolic pressure; LVP = left ventricular pressure; LV-SP = left ventricular systolic pressure; M = male; MBP = mean BP; MTBE = methyl tert-butyl ether; NA = not applicable; QTc = corrected QT interval; SBP = systolic BP; T_{max} = time to reach C_{max}.

a. Dose administered approximately 6 hours apart.

b. Animals were dosed in a cross-over study design during cardiovascular portion of the study.

c. The MTBE control consisted of 0.225% (w/v) MTBE in 2% (v/v) Polysorbate 80 in 0.5% (w/v) methylcellulose in purified water. The amount of MTBE in the control was based on the amount of MTBE present in the high dose group (15% MTBE). This was equivalent to 22.5 (11.25 BID) mg/kg/day MTBE.

d. Plasma samples obtained for pharmacokinetic analyses during the pharmacokinetic leg of the study.

e. Parameter not measured during the cardiovascular leg of the study.

f. All samples below assay limit of quantitation (<0.0100 µg/mL).

g. Parameter not measured during the pharmacokinetic leg of the study.