ゾコーバ錠 125mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 5
2.6.2 薬理試験の概要文 8
2.6.2.1 まとめ 8
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 11
2.6.2.2.1 In vitro 試験 11
2.6.2.2.1.1 SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ活性に対する阻害効果 11
2.6.2.2.1.2 SARS-CoV-2 感染細胞における抗ウイルス活性 12
2.6.2.2.1.3 抗 SARS-CoV-2 活性に対するヒト血清及びマウス血清の影響 16
2.6.2.2.1.4 エンシトレルビルフマル酸に対する SARS-CoV-2 耐性分離試験 16
2.6.2.2.1.5 エンシトレルビルフマル酸に対する SARS-CoV-2 変異体の薬剤感受性試験 19
2.6.2.2.1.6 リバースジェネティクス由来 SARS-CoV-2 変異体の複製能力及び薬剤感受性試験 21
2.6.2.2.1.7 抗 SARS-CoV-2 薬との併用による抗 SARS-CoV-2 効果 24
2.6.2.2.2 In vivo 試験 25
2.6.2.2.2.1 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおけるエンシトレルビルフマル酸の PK/PD 解析 25
2.6.2.2.2.2 SARS-CoV-2 感染マウスにおけるエンシトレルビルフマル酸遅延投与の PK/PD 解析 29
2.6.2.2.2.3 SARS-CoV-2 感染マウスにおけるエンシトレルビルフマル酸遅延投与による治療効果 33
2.6.2.3 副次的薬理試験 35
2.6.2.3.1 各種受容体，イオンチャネル及びトランスポーター並びに酵素に対する作用 35
2.6.2.3.2 ヒト初代培養細胞に対する細胞毒性 35
2.6.2.3.3 ヒト各種組織由来株化細胞に対する細胞毒性 36
2.6.2.3.4 ヒト細胞に対するミトコンドリア毒性 37
2.6.2.4 安全性薬理試験 38
2.6.2.4.1 中枢神経系 38
2.6.2.4.1.1 ラットの中枢神経系に対する作用 38
2.6.2.4.2 心血管系・呼吸系 38
2.6.2.4.2.1 hERG 導入細胞におけるカリウム電流に対する作用 38
2.6.2.4.2.2 In vivo におけるサルの血圧，心拍数，心電図及び呼吸に対する作用 38
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 39

2.6.2.6 考察及び結論 39
2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験 39
2.6.2.6.1.1 作用機序 39
2.6.2.6.1.2 In vitro 活性 40
2.6.2.6.1.3 In vivo 活性 41
2.6.2.6.1.4 臨床で有効性が期待できる血漿中濃度 41
2.6.2.6.1.5 エンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下 42
2.6.2.6.2 副次的薬理試験 43
2.6.2.6.3 安全性薬理試験 44
2.6.2.7 図表 45
2.6.2.8 参考文献 45

表

表 2.6.2.2-1 SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ活性に対するエンシトレルビルフマル酸の阻害効果 12
表 2.6.2.2-2 VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いた SARS-CoV-2 に対するエンシトレルビルフマル酸とレムデシビルの抗ウイルス活性 14
表 2.6.2.2-3 HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞を用いた SARS-CoV-2 に対するエンシトレルビルフマル酸とレムデシビルの抗ウイルス活性 15
表 2.6.2.2-4 ヒトプライマリー気道上皮細胞を用いた SARS-CoV-2 に対するエンシトレルビルフマル酸の抗ウイルス活性 15
表 2.6.2.2-5 ヒト血清及びマウス血清存在下での VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いた SARS-CoV-2 に対するエンシトレルビルフマル酸とレムデシビルの PA-EC_{50} 及び Potency shift 16
表 2.6.2.2-6 VeroE6/TMPRSS2 細胞におけるエンシトレルビルフマル酸耐性ウイルス分離試験において分離された SARS-CoV-2 変異体の nsp5 活性中心近くに位置するアミノ酸置換 17
表 2.6.2.2-7 VeroE6/TMPRSS2 細胞におけるエンシトレルビルフマル酸存在下で分離された SARS-CoV-2 変異体に対するエンシトレルビルフマル酸及びレムデシビルの抗ウイルス活性 20
表 2.6.2.2-8 VeroE6/TMPRSS2 細胞におけるリバースジェネティクス法により調製した SARS-CoV-2 nsp5 変異体に対するエンシトレルビルフマル酸，レムデシビル，PF-07321332，REGN-COV2 の抗ウイルス活性の Fold change 22
表 2.6.2.2-9 野生型ウイルスに対するアミノ酸置換ウイルスの競合増殖性 24
表 2.6.2.2-10 VeroE6/TMPRSS2 細胞におけるリバースジェネティクス法により調製した SARS-CoV-2 nsp5 変異体に対するエンシトレルビルフマル酸，レムデシビルの抗ウイルス活性の Fold change 24

表 2.6.2.2-11　エンシトレルビルフマル酸とレムデシビル，REGN-COV2，ソトロビマブ，ベブテロビマブ，チキサゲビマブ/シルガビマブ，EIDD-1931 又は PF-07321332 を併用したときの CI 25
表 2.6.2.2-12　SARS-CoV-2 感染マウスにおけるエンシトレルビルフマル酸単回経口投与後のエンシトレルビルの血漿中濃度 29
表 2.6.2.3-1　ヒト初代培養細胞に対するエンシトレルビルフマル酸の細胞毒性 36
表 2.6.2.3-2　ヒト各種組織由来株化細胞に対するエンシトレルビルフマル酸の細胞毒性 37
表 2.6.2.4-1　サルの血圧，心拍数，心電図及び呼吸に対する作用に関する試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ 39
表 2.6.2.6-1　SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染 24 時間後よりエンシトレルビルフマル酸を投与したときの初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価低下と C_{48hr}/PA-EC_{50} の関係性 42
表 2.6.2.6-2　安全性薬理コアバッテリー試験結果及び血漿中曝露量と臨床用量における血漿中曝露量との比 44

図

図 2.6.2.2-1　VeroE6/TMPRSS2 細胞におけるリバースジェネティクス由来の SARS-CoV-2 nsp5 変異体の増殖性 23
図 2.6.2.2-2　SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染直後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 1 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響 27
図 2.6.2.2-3　SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染直後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 2 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響 28
図 2.6.2.2-4　SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染直後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 4 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響 29
図 2.6.2.2-5　SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染 24 時間後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 2 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響 31
図 2.6.2.2-6　SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染 24 時間後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 3 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響 32
図 2.6.2.2-7　SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染 24 時間後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 1 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響 33
図 2.6.2.2-8　エンシトレルビルフマル酸を感染 24 時間後より 1 日 2 回投与したときの SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおける感染後 14 日間の生存率 34
図 2.6.2.2-9　エンシトレルビルフマル酸を感染 24 時間後より 1 日 2 回投与したときの SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおける感染後 5 日間の体重変化率 34

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
3CL	3C-like	(3C 様)
A193V	alanine-to-valine at amino acid position 193	N 末端側から 193 番目のアラニンがバリンに置換
A234S	alanine-to-serine at amino acid position 234	N 末端側から 234 番目のアラニンがセリンに置換
A255V	alanine-to-valine at amino acid position 255	N 末端側から 255 番目のアラニンがバリンに置換
ACE2	angiotensin-converting enzyme 2	アンジオテンシン変換酵素 2
ACh	acetylcholine	アセチルコリン
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
$AUC_{0\text{-}24\ (48)\ hr}$	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 (48) hours postdose	時間 0 から投与後 24 (48) 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
bid	bis in die, twice daily	1 日 2 回
$C_{24\ (48)\ hr}$	plasma concentration at 24 (48) hours after first administration	初回投与から 24 (48) 時間後の血漿中濃度
CC_{50}	concentration achieving 50% of cytotoxicity	50%細胞障害濃度
CCK	cholecystokinin	コレシストキニン
CI	combination index	(併用効果の評価指標)
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
D48G	aspartic acid-to-glycine at amino acid position 48	N 末端側から 48 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換
$EC_{50\ (90,\ 99,\ 99.9)}$	50% (90%, 99%, 99.9%) effective concentration	50% (90%, 99%, 99.9%) 有効濃度
F294L	phenylalanine-to-leucine at amino acid position 294	N 末端側から 294 番目のフェニルアラニンがロイシンに置換
G15S	glycine-to-serine at amino acid position 15	N 末端側から 15 番目のグリシンがセリンに置換
GISAID	Global Initiative on Sharing All Influenza Data	(インフルエンザ及び新型コロナウイルスの配列情報のデータベース)
H246Y	histidine-to-tyrosine at amino acid position 246	N 末端側から 246 番目のヒスチジンがチロシンに置換
hAEC	human airway epithelial cells	ヒトプライマリー気道上皮細胞
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
ID	identification number	(識別番号)
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
K88R	lysine-to-arginine at amino acid position 88	N 末端側から 88 番目のリシンがアルギニンに置換
K90R	lysine-to-arginine at amino acid position 90	N 末端側から 90 番目のリシンがアルギニンに置換

略号	英語	日本語
L87F	leucine-to-phenylalanine at amino acid position 87	N末端側から87番目のロイシンがフェニルアラニンに置換
L89F	leucine-to-phenylalanine at amino acid position 89	N末端側から89番目のロイシンがフェニルアラニンに置換
LC/MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法
M49L	methionine-to-leucine at amino acid position 49	N末端側から49番目のメチオニンがロイシンに置換
M49(M/L)	mixture of no substation and methionine-to-leucine at amino acid position 49	(N 末端側から 49 番目のメチオニンの無置換とロイシンへの置換の混合)
MC	methylcellulose aqueous solution	メチルセルロース水溶液
nsp5	non-structural protein 5	(非構造タンパク質 5)
NT	not tested	未実施
P52S	proline-to-serine at amino acid position 52	N末端側から52番目のプロリンがセリンに置換
P108S	proline-to-serine at amino acid position 108	N 末端側から 108 番目のプロリンがセリンに置換
P132H	proline-to-histidine at amino acid position 132	N 末端側から 132 番目のプロリンがヒスチジンに置換
PA-$EC_{50\ (90)}$	protein-adjusted $EC_{50\ (90)}$	(50% [90%] 有効濃度を血清タンパク存在量で補正した活性値)
PD	pharmacodynamics	薬力学
PDE	phosphodiesterase	ホスホジエステラーゼ
PK	pharmacokinetics	薬物動態学
qd	quaque die, once daily	1 日 1 回
qid	quarter in die, 4 times daily	1 日 4 回
QTc	corrected QT interval	補正 QT 間隔
r^2	coefficients of determination	決定係数
S144A	serine-to-alanine at amino acid position 144	N 末端側から 144 番目のセリンがアラニンに置換
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
SD	standard deviation	標準偏差
T198I	threonine-to-isoleucine at amino acid position 198	N 末端側から 198 番目のトレオニンがイソロイシンに置換
T21I	threonine-to-isoleucine at amino acid position 21	N末端側から21番目のトレオニンがイソロイシンに置換
T24I	threonine-to-isoleucine at amino acid position 21	N末端側から24番目のトレオニンがイソロイシンに置換
$TCID_{50}$	50% tissue culture infectious dose	50%組織細胞感染価
tid	ter in die, thrice daily	1 日 3 回

略号	英語	日本語
$Time_{High}$	total time above the target plasma concentration	目標を超える血漿中濃度を維持する時間
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2	Ⅱ型膜貫通型セリンプロテアーゼ

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

エンシトレルビルフマル酸共結晶 (以下，エンシトレルビルフマル酸) の評価濃度及び投与量はエンシトレルビル遊離塩基の量で示した.

効力を裏付ける試験

エンシトレルビルフマル酸は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) の 3C-like (3CL) プロテアーゼに作用し，SARS-CoV-2 の増殖を抑制すると考えられる．In vitro 試験では SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ活性に対するエンシトレルビルフマル酸の阻害活性の評価及び培養細胞に SARS-CoV-2 を感染させ，ウイルス増殖に起因する細胞障害活性を指標として，エンシトレルビルフマル酸の SARS-CoV-2 の増殖に対する抑制効果を評価した．In vivo 試験ではエンシトレルビルフマル酸を SARS-CoV-2 感染マウスに経口投与することにより，動物内でウイルス力価を低下させる作用，体重減少抑制効果及び生存率改善効果を評価した.

作用メカニズムを検討する試験において，エンシトレルビルフマル酸は SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ活性を阻害し，50%阻害濃度 (IC_{50}) は，0.0132 μmol/L であった．また，N 末端側から 15 番目のグリシンがセリンに置換 (G15S), N 末端側から 21 番目のトレオニンがイソロイシンに置換 (T21I)，N 末端側から 89 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換 (L89F)，N 末端側から 90 番目のリシンがアルギニンに置換 (K90R)，N 末端側から 108 番目のプロリンがセリンに置換 (P108S), N 末端側から 132 番目のプロリンがヒスチジンに置換 (P132H), N 末端側から 24 番目のトレオニンがイソロイシンに置換 (T24I), N 末端側から 88 番目のリシンがアルギニンに置換 (K88R), N 末端側から 193 番目のアラニンがバリンに置換 (A193V), N 末端側から 246 番目のヒスチジンがチロシンに置換 (H246Y), 及び N 末端側から 255 番目のアラニンがバリンに置換 (A255V)した SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼに対しても wild-type と同等の酵素阻害活性を示し，IC_{50} は 0.0080～0.0150 μmol/L であった．SARS-CoV-2 易感染性の II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ (TMPRSS2) を発現させたアフリカミドリザルの腎臓上皮細胞由来の細胞株である VeroE6/TMPRSS2 細胞，アンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) 及び TMPRSS2 を発現させたヒト胎児腎細胞由来の HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞を用いて，SARS-CoV-2 臨床分離株 (従来株，アルファ株，ベータ株，ガンマ株，デルタ株，シータ株，ラムダ株，ミュー株及びオミクロン株) 並びに従来株を起源とするマウス馴化株に対するエンシトレルビルフマル酸の細胞変性抑制効果を検討した．その結果，エンシトレルビルフマル酸は濃度依存的に細胞変性抑制効果を示し，各 SARS-CoV-2 臨床分離株に対するエンシトレルビルフマル酸の 50%有効濃度 (EC_{50}) は，VeroE6/TMPRSS2 細胞では 0.22～0.99 μmol/L，HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞では 0.026～0.064 μmol/L であった．マウス馴化株 (SARS-CoV-2 MA-P10 株 [mouse-adapted hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 株]) に対する EC_{50} は，VeroE6/TMPRSS2 細胞で 0.12 μmol/L であった．エンシトレルビルフマル酸の VeroE6/TMPRSS2 細胞及び HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞に対する 50%細胞障害濃度 (CC_{50}) はそれぞれ > 100 μmol/L 及び 55 μmol/L であり，エンシトレルビルフマル酸はスパイクタンパク質に変異が認められている複数の臨床分離株及びマウス馴化株に対して CC_{50} より極めて低い濃度 (> 101 倍) で抗 SARS-CoV-2 活性を有することが

示された．ヒトプライマリー気道上皮細胞 (hAEC) におけるエンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性を評価するため，ヒト鼻腔あるいは気管支上皮由来細胞のヒト気道上皮 in vitro 3D モデルである MucilAir™ に SARS-CoV-2 デルタ株 (Pango lineage B.1.617.2: hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021 株) 又はオミクロン株 [Pango lineage B.1.1.529: hCoV-19/Japan/TY38-873/2021 株，hCoV-19/Japan/TY41-702/2022 株])を感染させ，一定期間培養後，気相側に培地を添加し，回収した培地中に含まれるウイルス量を測定した．その結果，EC_{50}，EC_{90}，EC_{99} 及び $EC_{99.9}$ は，0.0114～0.127，0.0514～0.195，0.121～0.335 及び 0.227～0.373 μmol/L を示し，エンシトレルビルフマル酸は hAEC においても抗 SARS-CoV-2 活性を示した．また，エンシトレルビルフマル酸は核酸アナログであるレムデシビル，EIDD-1931 (モルヌピラビルの親化合物)，3CL プロテアーゼ阻害剤である PF-07321332 並びに中和抗体であるソトロビマブ，ベブテロビマブ，又はチキサゲビマブ/シルガビマブと併用することにより相加的な，カシリビマブ/イミデビマブの中和抗体カクテルである REGN-COV2 と併用することにより相加から相乗的な抗 SARS-CoV-2 活性を示した．エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性に対するヒト血清及びマウス血清の影響を検討した結果，血清添加による抗 SARS-CoV-2 活性の potency shift がみられ，100% ヒト血清及び 100%マウス血清存在下でのエンシトレルビルフマル酸の推定の protein-adjusted EC_{50} (PA-EC_{50}) はそれぞれ 3.02 μmol/L 及び 3.93 μmol/L であり，血清非存在下のときの抗 SARS-CoV-2 活性と比較すると，potency shift はどちらも 6 倍であった．以上の結果より，エンシトレルビルフマル酸では血清による抗 SARS-CoV-2 活性への影響はヒト，マウス血清で同程度であることが示された．

エンシトレルビルフマル酸に対する低感受性ウイルスについて情報を得るため，SARS-CoV-2 を VeroE6/TMPRSS2 細胞に感染させ，エンシトレルビルフマル酸存在下で継代培養したところ，3CL プロテアーゼをコードする non-structural protein 5 (nsp5) の酵素活性中心近くに位置するアミノ酸に置換が認められ，N 末端側から 48 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換 (D48G)，49 番目のメチオニンがロイシンに置換 (M49L)，52 番目のプロリンがセリンに置換 (P52S)，144番目のセリンがアラニンに置換 (S144A) したウイルスが分離された．また，S144A と M49L/S144A の混合による M49(M/L)/S144A のアミノ酸置換を有するウイルスも分離された．一方で，nsp5 領域にアミノ酸の置換が見られたウイルスでは，11 個の nsp5 切断部位には，アミノ酸の置換は検出されなかった．リバースジェネティクス法により作出した nsp5 D48G, M49L, P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を有する組換えウイルスは，エンシトレルビルフマル酸の感受性がそれぞれ 4.3倍，17 倍，3.7 倍，9.2 倍及び 100 倍低下したことから，nsp5 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換はエンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下の責任変異であると考えられる．これらのアミノ酸置換を有するウイルスは VeroE6/TMPRSS2 細胞において野生型ウイルスと同等の増殖能を示し，レムデシビル，PF-07321332 及び REGN-COV2 に対して交叉耐性を示さなかった．ヒト鼻腔由来細胞の MucilAir™ において，D48G，M49L 及び S144A のアミノ酸置換を持つウイルスの競合増殖能は，野生型ウイルスと同等であった．一方で，P52S 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を持つウイルスは，野生型ウイルスと比較して，競合増殖能は低かった．2022 年 5 月 27 日時点の Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID, https://www.gisaid.org/) の SARS-CoV-2 アミノ酸配列データを

用いて nsp5 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を有する配列の割合を解析したところ, D48G, M49L, P52S 及び S144A の割合は極めて低く (≤0.001%), M49L/S144A のアミノ酸置換は検出されなかった．また，2023 年 3 月 15 日時点の GISAID の SARS-CoV-2 アミノ酸配列データを用い，3CL プロテアーゼ共結晶構造においてエンシトレルビルから 5Å 以内に位置する 24 種のアミノ酸の置換割合を解析したところ，アミノ酸配列は極めて高度に保存されていた (≥99.946%).

第 2/3 相試験 (T1221 試験) Phase 2a Part において，エンシトレルビルフマル酸投薬後に認められた nsp5 領域の N 末端側から 87 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換 (L87F), N 末端側から 198 番目のトレオニンがイソロイシンに置換 (T198I), N 末端側から 234 番目のアラニンがセリンに置換 (A234S) 及び N 末端側から 246 番目のヒスチジンがチロシンに置換 (H246Y) した SARS-CoV-2 変異体をリバースジェネティクス法により調製し，エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性を評価した．L87F，T198I，A234S 及び H246Y のアミノ酸置換を有する変異体に対するエンシトレルビルフマル酸の EC_{50} は野生型と比較して，それぞれ 0.92 倍，1.5 倍，1.7 倍及び 0.90 倍となり，感受性の変化は認められなかった．

マウスでのエンシトレルビルフマル酸の抗ウイルス活性を評価するため，SARS-CoV-2 ガンマ株 (Pango lineage P.1: hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株) を経鼻接種した直後に，エンシトレルビルフマル酸を経口投与し，初回投与から 24 時間後の肺内ウイルス力価を測定したところ，用量依存的な肺内ウイルス力価の低下が認められた．感染直後にエンシトレルビルフマル酸を投与開始した場合では, 初回投与後の最高血漿中濃度 (C_{max}) /PA-EC_{50} 及び時間 0 から投与後 24 時間までの血漿中濃度−時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) /PA-EC_{50} が初回投与から 24 時間後の肺内ウイルス力価の低下を予測する薬物動態学 (PK) /薬力学 (PD) パラメータであった．一方，エンシトレルビルフマル酸を SARS-CoV-2 ガンマ株 (Pango lineage P.1: hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株) 感染 24 時間後から投与を開始し，初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価を測定した場合では，時間 0 から投与後 48 時間までの血漿中濃度−時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}48hr}$) /PA-EC_{50}，初回投与 48時間後の血中濃度 (C_{48hr}) /PA-EC_{50} 並びに 5 × PA-EC_{50}，10 × PA-EC_{50} を超える血漿中濃度を維持する時間 ($Time_{High}$ [5 × PA-EC_{50}]，$Time_{High}$ [10 × PA-EC_{50}]) が初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価の低下を予測する PK/PD パラメータであった．血漿中濃度の維持に関連している各パラメータ (C_{48hr}/PA-EC_{50}，$Time_{High}$ [5 × PA-EC_{50}，10 × PA-EC_{50}]) が肺内ウイルス力価の低下とよく相関していることから，マウスにおいて SARS-CoV-2 感染 24 時間後にエンシトレルビルフマル酸を投与開始した場合では，抗 SARS-CoV-2 活性を発揮するために必要な血漿中濃度を投与期間を通じて維持することが肺内ウイルス力価を低下させるために重要であることが示唆された．

マウス馴化株 (SARS-CoV-2 MA-P10 株 [mouse-adapted hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 株]) を感染させたマウス致死モデルにおいて, 感染 24 時間後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 2回 (bid) 5 日間経口投与し，ウイルス感染から 14 日間のマウスの体重変化率及び生存率を評価した結果，エンシトレルビルフマル酸を 4 mg/kg 以上の用量で投与した群では媒体投与群よりも生存率を改善し，有意に生存期間が延長した．さらに，感染 5 日後までの体重変化率の推移を媒体対照群と比較した結果，エンシトレルビルフマル酸投与群ではウイルス感染後の体重減

少が用量依存的に抑制された. 以上の結果から, エンシトレルビルフマル酸はマウスへの SARS-CoV-2 感染に伴う病態進展を抑制するものと考えられた.

副次的薬理試験

エンシトレルビルフマル酸の各種受容体，イオンチャネル，トランスポーター及び酵素に対する阻害作用, ヒトの初代培養細胞及び各種組織由来株化細胞に対する細胞毒性, 並びに HepG2 細胞 (ヒト肝細胞癌細胞株) に対するミトコンドリア毒性を評価した.

各種受容体，イオンチャネル，トランスポーター及び酵素に対する影響に関して，108 種の分子標的 (49 種の受容体, 19 種のイオンチャネル, 6 種のトランスポーター, 31 種の酵素及び 3種のキナーゼ) の各放射性リガンド結合又は酵素活性に対するエンシトレルビルフマル酸の in vitro 阻害活性を評価した．その結果，アデノシントランスポーターのアデノシン取り込み作用に対する IC_{50} は 1.43 μmol/L，ホスホジエステラーゼ (PDE) 4A1A，PDE4B1，PDE4C1 及び PDE4D2 の酵素活性に対する IC_{50} は，それぞれ 63.2，69.1，75.7 及び 73.4 μmol/L であった．その他の分子に対して 100 μmol/L (53.2 μg/mL) まで影響を示さなかった．いずれもエンシトレルビルフマル酸の SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼに対する IC_{50} の 100 倍以上であることから，エンシトレルビルフマル酸は SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼに対して高い選択性を示した.

異なるヒト組織に由来する 9 種の株化細胞及び 3 種のヒト初代培養細胞に対する CC_{50} を細胞中アデノシン三リン酸 (ATP) 量を指標に算出したところ, いずれの細胞においてもエンシトレルビルフマル酸の CC_{50} は 72 μg/mL (135 μmol/L) 超える濃度と推定され，EC_{50} (0.026～0.99 μmol/L) との間に約 140 倍以上の十分な乖離がみられた．また，エンシトレルビルフマル酸は HepG2 細胞に対して 300 μg/mL の濃度までミトコンドリアに対する障害を示さなかった.

安全性薬理試験

エンシトレルビルフマル酸の安全性を薬理学的観点から評価する目的で，安全性薬理コアバッテリー試験を実施し，中枢神経系，心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した.

ラット中枢神経系試験において，最高用量の 1000 mg/kg において尿量及び糞量の減少が認められたが，1000 mg/kg まで一般症状及び神経行動学的機能への影響は認められなかった.

サルの心血管及び呼吸系試験において，50 mg/kg 以上の用量で軽度の心拍数の増加が認められたが，最高用量の 150 mg/kg まで血圧及び心電図には影響が認められなかった．また最高用量の 150 mg/kg まで呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった.

ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャネル発現細胞を用いた遅延整流カリウム電流 (hERG 電流) に対する試験において，最高濃度の 100 μmol/L (53.2 μg/mL) まで hERG 電流に対して 50%を超える阻害作用を示さなかった (IC_{50} > 100 μmol/L).

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In vitro 試験

2.6.2.2.1.1 SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ活性に対する阻害効果

評価資料 4.2.1.1-01，4.2.1.1-02，4.2.1.1-03

参考資料 4.2.1.1-04

概要表 2.6.3.2.1，2.6.3.2.2，2.6.3.2.3，2.6.3.2.4

SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼタンパク質を用いてエンシトレルビルフマル酸の 3CL プロテアーゼ活性に対する阻害活性を検討した．エンシトレルビルフマル酸の SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ活性に対する IC_{50} は，0.0132 µmol/L であった (表 2.6.2.2-1)．また，G15S，T21I，T24I，K88R，L89F，K90R，P108S，P132H，A193V，H246Y 及び A255V のアミノ酸置換を有する SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼに対しても wild-type と同等の酵素阻害活性を示し，IC_{50} は 0.0080～0.0150 µmol/L であった．

表 2.6.2.2-1　SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ活性に対するエンシトレルビルフマル酸の阻害効果

Amino acid substitution	IC_{50} (nmol/L)	Fold change in IC_{50}
wild-type	13.2 ± 1.1	-
G15S	8.0 ± 1.1	0.60 ± 0.08
T21I	14.3 ± 0.8	1.08 ± 0.06
T24I	14.0 ± 2.7	1.06 ± 0.20
K88R	12.1 ± 1.1	0.91 ± 0.08
L89F	15.0 ± 1.2	1.13 ± 0.09
K90R	9.7 ± 1.1	0.73 ± 0.09
P108S	13.2 ± 1.0	1.00 ± 0.07
P132H	14.4 ± 2.2	1.09 ± 0.16
A193V	10.2 ± 0.8	0.77 ± 0.06
H246Y	12.5 ± 1.0	0.95 ± 0.08
A255V	10.1 ± 0.4	0.77 ± 0.04

Fold change in IC_{50} = IC_{50} value against each mutant SARS-CoV-2 3CL protease/IC_{50} value against wild-type; IC_{50} = 50% inhibitory concentration

Data are expressed as the mean ± SD of 3 independent experiments.

2.6.2.2.1.2　SARS-CoV-2 感染細胞における抗ウイルス活性

評価資料 4.2.1.1-05，4.2.1.1-06，4.2.1.1-07，4.2.1.1-08，4.2.1.1-09，4.2.1.1-10，4.2.1.1-11，4.2.1.1-12，4.2.1.1-13，4.2.1.1-14，4.2.1.1-15，4.2.1.1-16，4.2.1.1-17，4.2.1.1-18，4.2.1.1-19，4.2.1.1-20，4.2.1.1-38

概要表 2.6.3.2.5，2.6.3.2.6，2.6.3.2.7，2.6.3.2.8，2.6.3.2.9，2.6.3.2.10，2.6.3.2.11，2.6.3.2.12，2.6.3.2.13，2.6.3.2.14，2.6.3.2.15，2.6.3.2.16，2.6.3.2.17，2.6.3.2.18，2.6.3.2.19，2.6.3.2.20，2.6.3.2-38

エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 効果を評価するために，SARS-CoV-2 易感染性の TMPRSS2 を発現させたアフリカミドリザルの腎臓上皮細胞由来の細胞株である VeroE6/TMPRSS2 細胞及び ACE2 及び TMPRSS2 を発現させたヒト胎児腎細胞由来の細胞株である HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞を用いて，エンシトレルビルフマル酸の細胞変性抑制効果を検討した．SARS-CoV-2 は従来株 (Pango lineage A：CoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 株) 及びス

パイクタンパクに変異を有する臨床分離株であるアルファ株 (Pango lineage B.1.1.7：hCoV-19/Japan/QK002/2020 株, hCoV-19/Japan/QHN001/2020 株, hCoV-19/Japan/QHN002/2020 株), ベータ株 (Pango lineage B.1.351：hCoV-19/Japan/TY8-612/2021 株), ガンマ株 (Pango lineage P.1：hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株, hCoV-19/Japan/TY7-503/2021 株), デルタ株 (Pango lineage B.1.617.2：hCoV 19/Japan/TY11-927-P1/2021 株), シータ株 (Pango lineage P.3: hCoV-19/Japan/TY28-444/2021 株), ラムダ株 (Pango lineage C.37: hCoV-19/Japan/TY33-456/2021 株), ミュー株 (Pango lineage B.1.621: hCoV-19/Japan/TY26-717/2021 株) 及びオミクロン株 (Pango lineage B.1.1.529：hCoV-19/Japan/TY38-873/2021 株, hCoV-19/Japan/TY38-871/2021 株, hCoV-19/Japan/TY40-385/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-721/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-716/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-703/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-763/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-704/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-702/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-820/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-828/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-796/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-832/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-795/2022 株, hCoV-19/Japan/23-018/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-951/2023 株, hCoV-19/Japan/TY41-984/2023 株, hCoV-19/Japan/TY41-831/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-686/2022 株) 並びにマウス馴化株 (SARS-CoV-2 MA-P10 株 [mouse-adapted hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 株]) を用いた.

SARS-CoV-2 臨床分離株 (従来株, アルファ株, ベータ株, ガンマ株, デルタ株, シータ株, ラムダ株, ミュー株及びオミクロン株) に対するエンシトレルビルフマル酸の EC_{50} は, VeroE6/TMPRSS2 細胞では 0.22～0.99 μmol/L, HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞では 0.026～0.064 μmol/L であった (表 2.6.2.2-2, 表 2.6.2.2-3). マウス馴化株に対するエンシトレルビルフマル酸の EC_{50} は, VeroE6/TMPRSS2 細胞では 0.12 μmol/L であった. エンシトレルビルフマル酸の VeroE6/TMPRSS2 細胞及び HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞に対する CC_{50} は>100 μmol/L 及び 55 μmol/L であった.

以上の結果から, エンシトレルビルフマル酸はスパイクタンパク質に変異が認められている複数の臨床分離株及びマウス馴化株に対して株間の感受性差が小さく, CC_{50} より極めて低い濃度 (> 101 倍) で抗 SARS-CoV-2 活性を有することが示された.

また hAEC におけるエンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性を評価するため, ヒト鼻腔あるいは気管支上皮由来細胞のヒト気道上皮 in vitro 3D モデルである MucilAir™ に SARS-CoV-2 デルタ株 (Pango lineage B.1.617.2：hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021 株) 又はオミクロン株 [Pango lineage B.1.1.529: hCoV-19/Japan/TY38-873/2021 株, hCoV-19/Japan/TY41-702/2022 株]) を感染させ, 一定期間培養後, 気相側に培地を添加し, 回収した培地中に含まれるウイルス量を指標として抗ウイルス活性を測定した. その結果, EC_{50}, EC_{90}, EC_{99} 及び $EC_{99.9}$ (気相側に培地を添加し, 回収した培地中に含まれるウイルス量を 1/2, 1/10, 1/100 及び 1/1000 に低下させるエンシトレルビルフマル酸の濃度) は, 0.0114 ～0.127, 0.0514～0.195, 0.121～0.335 及び 0.227～0.373 μmol/L を示し, hAEC においても抗 SARS-CoV-2 活性を有することが示された (表 2.6.2.2-4).

表 2.6.2.2-2 VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いた SARS-CoV-2 に対するエンシトレルビルフマル酸とレムデシビルの抗ウイルス活性

Strains	Pango Lineage	EC_{50} (μmol/L)			
		Ensitrelvir fumaric acid		Remdesivir	
		Mean	SD	Mean	SD
hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020	A	0.37	0.060	1.9	0.14
hCoV-19/Japan/QK002/2020	B.1.1.7	0.33	0.050	0.87	0.027
hCoV-19/Japan/QHN001/2020	B.1.1.7	0.31	0.070	0.97	0.14
hCoV-19/Japan/QHN002/2020	B.1.1.7	0.46	0.044	0.99	0.18
hCoV-19/Japan/TY8-612/2021	B.1.351	0.40	0.048	1.2	0.30
hCoV-19/Japan/TY7-501/2021	P.1	0.50	0.048	2.1	0.39
hCoV-19/Japan/TY7-503/2021	P.1	0.43	0.00085	1.0	0.16
hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021	B.1.617.2	0.41	0.014	1.6	0.22
hCoV-19/Japan/TY28-444/2021	P.3	0.29	0.028	0.98	0.10
hCoV-19/Japan/TY33-456/2021	C.37	0.27	0.048	3.2	0.61
hCoV-19/Japan/TY26-717/2021	B.1.621	0.43	0.069	3.9	0.41
hCoV-19/Japan/TY38-873/2021	BA.1.18[a]	0.29	0.054	1.1	0.28
hCoV-19/Japan/TY38-871/2021	BA.1.1	0.36	0.077	1.0	0.052
hCoV-19/Japan/TY40-385/2022	BA.2	0.52	0.091	1.0	0.23
hCoV-19/Japan/TY41-721/2022	BA.2.12.1	0.24	0.077	0.49	0.20
hCoV-19/Japan/TY41-716/2022	BA.2.75	0.30	0.032	0.91	0.080
hCoV-19/Japan/TY41-703/2022	BA.4.1[b]	0.22	0.072	0.65	0.19
hCoV-19/Japan/TY41-763/2022	BA.4.6	0.30	0.074	0.87	0.074
hCoV-19/Japan/TY41-704/2022	BA.5.2.1	0.37	0.018	1.7	0.29
hCoV-19/Japan/TY41-702/2022	BE.1 (BA.5-like)[c]	0.40	0.082	1.3	0.54
hCoV-19/Japan/TY41-820/2022	BF.7	0.51	0.074	1.2	0.090
hCoV-19/Japan/TY41-828/2022	BF.7.4.1	0.55	0.081	1.6	0.49
hCoV-19/Japan/TY41-796/2022	BQ.1.1	0.48	0.042	2.2	0.70
hCoV-19/Japan/TY41-832/2022	CH.1.1.11	0.38	0.091	1.2	0.26
hCoV-19/Japan/TY41-795/2022	XBB.1	0.33	0.098	0.95	0.075
hCoV-19/Japan/23-018/2022	XBB.1.5	0.57	0.074	1.0	0.18
hCoV-19/Japan/TY41-951/2023	XBB.1.9.1	0.99	0.11	3.0	0.31
hCoV-19/Japan/TY41-984/2023	XBB.1.16	0.33	0.026	1.1	0.20
hCoV-19/Japan/TY41-831/2022	XBF	0.29	0.015	1.0	0.16
hCoV-19/Japan/TY41-686/2022	XE	0.44	0.037	1.1	0.36
SARS-CoV-2 MA-P10	-	0.12	0.040	1.6	0.11

SD = standard deviation
The mean and SD were calculated from 3 independent experiments
a Described as BA.1 (S-217622-EB-132-N [Location in CTD 4.2.1.1-08])
b Described as BA.4 (S-217622-EB-177-N [Location in CTD 4.2.1.1-11])
c Described as BA.5 (S-217622-EB-177-N [Location in CTD 4.2.1.1-11])

表 2.6.2.2-3 HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞を用いた SARS-CoV-2 に対するエンシトレルビルフマル酸とレムデシビルの抗ウイルス活性

Strains	Pango Lineage	EC_{50} (μmol/L)			
		Ensitrelvir fumaric acid		Remdesivir	
		Mean	SD	Mean	SD
hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020	A	0.027	0.0018	0.012	0.0020
hCoV-19/Japan/QK002/2020	B.1.1.7	0.044	0.0068	0.011	0.0024
hCoV-19/Japan/TY8-612/2021	B.1.351	0.038	0.0059	0.010	0.00045
hCoV-19/Japan/TY7-501/2021	P.1	0.026	0.0051	0.0061	0.0011
hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021	B.1.617.2	0.058	0.0073	0.0094	0.0022
hCoV-19/Japan/TY38-873/2021	BA.1.18[a]	0.064	0.033	0.015	0.0051

The mean and SD were calculated from 3 independent experiments
a Described as BA.1 (S-217622-EB-132-N [Location in CTD 4.2.1.1-08])

表 2.6.2.2-4 ヒトプライマリー気道上皮細胞を用いた SARS-CoV-2 に対するエンシトレルビルフマル酸の抗ウイルス活性

MucilAir™	Strains	Pango Lineage	Day		Ensitrelvir fumaric acid	
					Mean	SD
Nasal epithelial cells	hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021	B.1.617.2	2	EC_{50} (μmol/L)	0.0177	0.0098
				EC_{90} (μmol/L)	0.0514	0.0182
				EC_{99} (μmol/L)	0.121	0.005
				$EC_{99.9}$ (μmol/L)	0.266	0.083
			3	EC_{50} (μmol/L)	0.0570	0.0307
				EC_{90} (μmol/L)	0.117	0.026
				EC_{99} (μmol/L)	0.207	0.071
				$EC_{99.9}$ (μmol/L)	0.329	0.105
Nasal epithelial cells	hCoV-19/Japan/TY38-873/2021	BA.1.18[a]	1	EC_{50} (μmol/L)	0.0236	0.0116
				EC_{90} (μmol/L)	0.0660	0.0125
				EC_{99} (μmol/L)	0.179	0.0415
				$EC_{99.9}$ (μmol/L)	0.317	0.0714
			2	EC_{50} (μmol/L)	0.0827	0.0743
				EC_{90} (μmol/L)	0.160	0.0556
				EC_{99} (μmol/L)	0.250	0.0420
				$EC_{99.9}$ (μmol/L)	0.372	0.0850
Nasal epithelial cells	hCoV-19/Japan/TY41-702/2022	BE.1 (BA.5-like)	2	EC_{50} (μmol/L)	0.0420[b]	-
				EC_{90} (μmol/L)	0.0601	0.0328
				EC_{99} (μmol/L)	0.132	0.016
				$EC_{99.9}$ (μmol/L)	0.227	0.024
Bronchial epithelial cells	hCoV-19/Japan/TY38-873/2021	BA.1.18[a]	3	EC_{50} (μmol/L)	0.0114[b]	-
				EC_{90} (μmol/L)	0.154	0.0518
				EC_{99} (μmol/L)	0.255	0.0580
				$EC_{99.9}$ (μmol/L)	0.320[b]	-
			4	EC_{50} (μmol/L)	0.127	0.0604
				EC_{90} (μmol/L)	0.195	0.0196
				EC_{99} (μmol/L)	0.335	0.100
				$EC_{99.9}$ (μmol/L)	0.373[b]	-

The mean and SD were calculated from 3 independent experiments.
a Described as BA.1 (S-217622-EB-149-N [Location in CTD 4.2.1.1-18] or S-217622-EB-150-N [Location in CTD 4.2.1.1-20])
b mean value of 2 independent experiments.

2.6.2.2.1.3 抗 SARS-CoV-2 活性に対するヒト血清及びマウス血清の影響

評価資料 4.2.1.1-21

概要表 2.6.3.2.21

VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて，エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性に対するヒト血清及びマウス血清の影響を検討した．ウイルスは SARS-CoV-2 ガンマ株 (Pango lineage P.1: hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株) を用いた．VeroE6/TMPRSS2 細胞での抗 SARS-CoV-2 アッセイでは，100%ヒト血清及び 100%マウス血清存在下でのエンシトレルビルフマル酸の推定の PA-EC_{50} はそれぞれ 3.02 µmol/L，3.93 µmol/L であり，血清非存在下のときの抗 SARS-CoV-2 活性と比較すると，potency shift はどちらも 6 倍であった．以上の結果よりエンシトレルビルフマル酸では血清による抗 SARS-CoV-2 ウイルス活性への影響はヒト，マウス血清で同程度であることが示された (表 2.6.2.2-5).

表 2.6.2.2-5 ヒト血清及びマウス血清存在下での VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いた SARS-CoV-2 に対するエンシトレルビルフマル酸とレムデシビルの PA-EC_{50} 及び Potency shift

Substance	Extrapolated values to 100% human serum				Extrapolated values to 100% mouse serum			
	Potency shift		PA-EC_{50} (µmol/L)		Potency shift		PA-EC_{50} (µmol/L)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Ensitrelvir fumaric acid	6	1	3.02	0.76	6	2	3.93	1.88
Remdesivir	1	0	1.67	0.60	51	26	213.98	60.31

The mean and SD were calculated from 3 independent experiments

2.6.2.2.1.4 エンシトレルビルフマル酸に対する SARS-CoV-2 耐性分離試験

評価資料 4.2.1.1-22，4.2.1.1-23，4.2.1.1-24

概要表 2.6.3.2.22，2.6.3.2.23，2.6.3.2.24

SARS-CoV-2 従来株 (Pango lineage A: hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 株)，アルファ株 (Pango lineage B.1.1.7: hCoV-19/Japan/QHN001/2020 株)，ベータ株 (Pango lineage B.1.351: hCoV-19/Japan/TY8-612/2021 株)，ガンマ株 (Pango lineage P.1: hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株) 及びデルタ株 (Pango lineage B.1.617.2: hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021 株) を VeroE6/TMPRSS2 細胞に感染させ，様々な濃度のエンシトレルビルフマル酸存在下で継代培養した．4 回継代培養後の SARS-CoV-2 nsp5 領域のシーケンス解析を実施したところ，3CL プロテアーゼをコードする nsp5 の酵素活性中心近くに位置するアミノ酸に置換が認められ，D48G，M49L，P52S 及び S144A のアミノ酸置換を有するウイルスが分離された．また，S144A と M49L/S144A の混合による M49(M/L)/S144A のアミノ酸置換を有するウイルスも分離された (表 2.6.2.2-6)．一方で，nsp5 領域にアミノ酸の置換が見られたウイルスでは，11 個の nsp5 切断部位には，アミノ酸の置換は検出されなかった．

表 2.6.2.2-6 VeroE6/TMPRSS2 細胞におけるエンシトレルビルフマル酸耐性ウイルス分離試験において分離された SARS-CoV-2 変異体の nsp5 活性中心近くに位置するアミノ酸置換

Strain	ID[a]	Concentration of ensitrelvir fumaric acid at each point (μmol/L)					CPE (%) at the end of culture	nsp5 amino acid substitution
		Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5[b]		
hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020	−	10	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	−	10	3.3	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	−	3.3	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	−	3.3	3.3	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	P4-1	1.1	10	10	10	−	91 - 100	M49L
	P4-2	1.1	3.3	10	10	−	91 - 100	M49L
	P4-3	0.37	10	10	10	−	91 - 100	M49L
	P4-4	0.37	3.3	10	10	−	51 - 90	M49L
	P5-1	0	0	0	0	0	91 - 100	No mutation

Strain	ID[a]	Concentration of ensitrelvir fumaric acid at each point (μmol/L)					CPE (%) at the end of culture	nsp5 amino acid substitution
		Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5[b]		
hCoV-19/Japan /QHN001/2020	−	10	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	−	10	3.3	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	−	3.3	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	P4-1	3.3	3.3	10	10	−	91 - 100	M49L
	P4-2	3.3	3.3	3.3	10	−	91 - 100	M49L
	−	1.1	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	P4-3	1.1	3.3	10	10	−	91 - 100	M49(M/L)/S144A
	P4-4	1.1	3.3	3.3	10	−	91 - 100	S144A
	−	0.37	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	−	0.37	3.3	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	P4-5	0.37	3.3	3.3	10	−	51 - 90	D48G
	P4-6	0.37	3.3	1.1	10	−	51 - 90	D48G
	P5-1	0	0	0	0	0	91 - 100	No mutation
hCoV-19/Japan /TY8-612/2021	−	10	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	P4-4	10	3.3	10	10	−	91 - 100	M49L
	−	3.3	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	P4-5	3.3	3.3	10	10	−	91 - 100	P52S
	P4-1	1.1	10	10	10	−	51 - 90	M49L
	P4-2	1.1	3.3	10	10	−	51 - 90	M49L
	−	0.37	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	P4-3	0.37	3.3	10	10	−	91 - 100	M49L
	P5-1	0	0	0	0	0	91 - 100	No mutation
hCoV-19/Japan /TY7-501/2021	P4-1	10	10	10	10	−	0 - 50	S144A
	P4-2	10	3.3	10	10	−	50 - 90	S144A
	P4-3	10	1.1	10	10	−	0 - 50	M49L
	P4-4	3.3	10	10	10	−	90 - 100	M49L
	P4-5	3.3	3.3	10	10	−	90 - 100	S144A
	P4-6	3.3	1.1	10	10	−	50 - 90	M49(M/L)/S144A
	P4-7	1.1	10	10	10	−	0 - 50	S144A
	P4-8	1.1	3.3	10	10	−	90 - 100	S144A
	P4-9	1.1	1.1	10	10	−	90 - 100	M49L
	P4-10	0	0	0	0	−	90 - 100	No mutation
	P4-11	0	0	0	0	−	90 - 100	No mutation
hCoV-19/Japan /TY11-927-P1/2021	−	10	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	−	10	3.3	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	−	3.3	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	−	3.3	3.3	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	P4-1	3.3	1.1	10	10	−	91 - 100	M49L
	P4-2	3.3	1.1	3.3	10	−	91 - 100	M49L
	−	1.1	10	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	−	1.1	3.3	10	0.041 - 10	−	1 - 50	NT
	P4-3	1.1	1.1	10	1.1	−	51 - 90	D48G
	P4-4	1.1	1.1	3.3	1.1	−	91 - 100	D48G
	P5-1	0	0	0	0	0	91 - 100	No mutation

ID = identification number; NT = not tested

CPE (%) at the end of culture: the degree of CPE in whole well in observation under microscopy at the end of culture.

Amino acids indicated by slash means multiple amino acid substitutions were identified. Two amino acids indicated by slash in parentheses means mixture of 2 amino acid sequence which was identified in same position.

a Minus means that ID was not given because it was not subject to sequence analysis.

b Minus means that the passage was not conducted because it was completed in 4 times.

2.6.2.2.1.5 エンシトレルビルフマル酸に対する SARS-CoV-2 変異体の薬剤感受性試験

評価資料 4.2.1.1-25

概要表 2.6.3.2.25

エンシトレルビルフマル酸存在下で分離した nsp5 領域にアミノ酸置換を有する SARS-CoV-2 変異体について，エンシトレルビルフマル酸及びレムデシビルの抗 SARS-CoV-2 活性を評価した．エンシトレルビルフマル酸非存在下で継代培養した nsp5 領域にアミノ酸置換を有さないウイルスと比較して，D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49(M/L)/S144A のアミノ酸置換を有するウイルスではエンシトレルビルフマル酸の感受性がそれぞれ 3.7～6.5 倍，12～41 倍，5.5 倍，8.5～11 倍及び 100 倍低下した (表 2.6.2.2-7)．一方，これら変異体のレムデシビルに対する感受性は 0.40～1.8 倍であり，交叉耐性は示さなかった．

表 2.6.2.2-7 VeroE6/TMPRSS2 細胞におけるエンシトレルビルフマル酸存在下で分離された SARS-CoV-2 変異体に対するエンシトレルビルフマル酸及びレムデシビルの抗ウイルス活性

Substance	Strain	ID	Amino acid substitution of nsp5 region[a]	EC_{50}	Fold change
Ensitrelvir fumaric acid	hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020	P4-1	M49L	5.9 ± 2.6	12 ± 5
		P5-1	No mutation	0.47 ± 0.02	1.0
	hCoV-19/Japan/QHN001/2020	P4-1	M49L	12 ± 1	26 ± 1
		P4-4	S144A	4.0 ± 0.3	8.5 ± 0.4
		P4-5	D48G	1.8 ± 0.4	3.7 ± 0.7
		P5-1	No mutation	0.47 ± 0.01	1.0
	hCoV-19/Japan/TY8-612/2021	P4-1	M49L	10 ± 1	21 ± 1
		P4-5	P52S	2.6 ± 0.8	5.5 ± 1.5
		P5-1	No mutation	0.48 ± 0.00	1.0
	hCoV-19/Japan/TY7-501/2021	P4-3[b]	M49L	13 ± 0	27 ± 1
		P4-6[c]	M49(M/L)/ S144A	49 ± 5	100 ± 10
		P4-7[c]	S144A	5.4 ± 1.1	11 ± 2
		P4-10[b]	No mutation	0.48 ± 0.02	1.0
	hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021	P4-2	M49L	13 ± 1	41 ± 2
		P4-4	D48G	2.0 ± 0.4	6.5 ± 0.9
		P5-1	No mutation	0.31 ± 0.03	1.0
Remdesivir	hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020	P4-1	M49L	1.1 ± 0.2	0.40 ± 0.03
		P5-1	No mutation	2.8 ± 0.2	1.0
	hCoV-19/Japan/QHN001/2020	P4-1	M49L	1.6 ± 0.2	0.58 ± 0.09
		P4-4	S144A	1.4 ± 0.2	0.49 ± 0.07
		P4-5	D48G	2.0 ± 0.3	0.71 ± 0.09
		P5-1	No mutation	2.8 ± 0.7	1.0
	hCoV-19/Japan/TY8-612/2021	P4-1	M49L	1.1 ± 0.1	0.66 ± 0.12
		P4-5	P52S	1.4 ± 0.0	0.86 ± 0.19
		P5-1	No mutation	1.7 ± 0.4	1.0
	hCoV-19/Japan/TY7-501/2021	P4-3[b]	M49L	3.1 ± 0.8	1.8 ± 0.2
		P4-6[c]	M49(M/L)/ S144A	1.6 ± 0.3	0.97 ± 0.08
		P4-7[c]	S144A	3.0 ± 1.1	1.8 ± 0.2
		P4-10[b]	No mutation	1.7 ± 0.4	1.0
	hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021	P4-2	M49L	1.7 ± 0.3	1.1 ± 0.1
		P4-4	D48G	2.7 ± 0.2	1.7 ± 0.2
		P5-1	No mutation	1.6 ± 0.3	1.0

Fold change = EC_{50} value against each SARS-CoV-2 strain/EC_{50} value against reference strain

Data are expressed as the mean ± SD of 3 independent experiments.

a Ensitrelvir fumaric acid treatment emerged amino acid substitutions are shown.

b ID P4-3 has amino acid substitution phenylalanine-to-leucine at amino acid position 294 (F294L). ID P4-10 is the mixture of F294F and F294L. Since parent strain used in the previous study is the mixture of F294F and F294L (S-217622-EB-074-N [Location in CTD 4.2.1.1-22]], it was not considered to be ensitrelvir fumaric acid treatment-induced amino acid substitution.

c Amino acid at position 75 has synonymous substitutions.

2.6.2.2.1.6　リバースジェネティクス由来 SARS-CoV-2 変異体の複製能力及び薬剤感受性試験

評価資料 4.2.1.1-26，4.2.1.1-27，4.2.1.1-28，4.2.1.1-29，4.2.1.1-36

参考資料 4.2.1.1-37

概要表 2.6.3.2.26，2.6.3.2.27，2.6.3.2.28，2.6.3.2.29，2.6.3.2.36，2.6.3.2.37

エンシトレルビルフマル酸に対する SARS-CoV-2 耐性分離試験で同定された nsp5 領域のアミノ酸置換 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A を有する SARS-CoV-2 変異体をリバースジェネティクス法により調製し，エンシトレルビルフマル酸，レムデシビル，PF-07321332 及び REGN-COV2 の抗 SARS-CoV-2 活性を評価した．野生型と比較して，D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を有する変異体ではエンシトレルビルフマル酸の感受性がそれぞれ 4.3 倍，17 倍，3.7 倍，9.2 倍及び 100 倍低下した (表 2.6.2.2-8)．一方，これら変異体に対するレムデシビル，PF-07321332 及び REGN-COV2 の感受性はそれぞれ 0.52～1.0 倍，0.68～1.4 倍及び 0.91～1.0 倍であり，交叉耐性は示さなかった．

次に，野生型及びこれら変異体を VeroE6/TMPRSS2 細胞へ感染させ，ウイルスの増殖性を評価した．変異体の増殖性は本試験条件下では野生型と同程度であり，nsp5 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換はウイルスの複製能力に明らかな影響を及ぼさないことが示された (図 2.6.2.2-1)．さらに，ヒト鼻腔由来細胞の MucilAir™ に対し，野生型又は変異ウイルスを 1:1 又は 1:9 の比率で感染させ，競合増殖性を評価した．nsp5 領域の D48G，M49L 及び S144A のアミノ酸置換を持つウイルスの競合増殖能は，野生型ウイルスと同等であった．一方で，nsp5 領域の P52S 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を持つウイルスは，野生型ウイルスと比較して，競合増殖能は低かった (表 2.6.2.2-9)．

2022 年 5 月 27 日時点の GISAID の SARS-CoV-2 アミノ酸配列データ (n＝10,018,171) を用いて nsp5 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を有する配列の割合を解析した．その結果，それぞれの割合は D48G は 0.001% (n＝109)，M49L は 0.001% (n＝43)，P52S は 0.001% (n＝37)，S144A は< 0.001% (n＝9) であった．また M49L/S144A のアミノ酸置換は検出されなかった．また，2023 年 3 月 15 日時点の GISAID の SARS-CoV-2 アミノ酸配列データ (n=13,709,665) を用い，3CL プロテアーゼ共結晶構造においてエンシトレルビルから 5Å 以内に位置する 24 種のアミノ酸の置換割合を解析したところ，アミノ酸配列は極めて高度に保存されていた．

第 2/3 相試験 (T1221 試験) Phase 2a Part において，エンシトレルビルフマル酸投薬後に認められた nsp5 領域のアミノ酸置換 L87F，T198I，A234S 及び H246Y を有する SARS-CoV-2 変異体をリバースジェネティクス法により調製し，エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性を評価した．L87F，T198I，A234S 及び H246Y のアミノ酸置換を有する変異体に対するエンシトレルビルフマル酸の EC_{50} は野生型と比較して，それぞれ 0.92 倍，1.5 倍，1.7 倍及び 0.90 倍となり，感受性の変化は認められなかった (表 2.6.2.2-10)．

表 2.6.2.2-8 VeroE6/TMPRSS2 細胞におけるリバースジェネティクス法により調製した SARS-CoV-2 nsp5 変異体に対するエンシトレルビルフマル酸，レムデシビル，PF-07321332，REGN-COV2 の抗ウイルス活性の Fold change

Substance	Strain	Fold change
Ensitrelvir fumaric acid	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020 (wild-type)	1.0
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/D48G	4.3 ± 1.1
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/M49L	17 ± 6
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/P52S	3.7 ± 1.9
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/S144A	9.2 ± 5.8
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/M49L/S144A	100 ± 30
Remdesivir	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020 (wild-type)	1.0
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/D48G	1.0 ± 0.1
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/M49L	0.52 ± 0.03
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/P52S	1.0 ± 0.2
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/S144A	0.90 ± 0.19
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/M49L/S144A	0.53 ± 0.03
PF-07321332[a]	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020 (wild-type)	1.0
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/D48G	1.0 ± 0.3
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/M49L	0.68 ± 0.15
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/P52S	0.54 ± 0.20
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/S144A	1.4 ± 0.2
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/M49L/S144A	1.3 ± 0.0
REGN-COV2	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020 (wild-type)	1.0
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/D48G	0.91 ± 0.31
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/M49L	0.93 ± 0.02
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/P52S	0.91 ± 0.01
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/S144A	1.0 ± 0.0
	rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/M49L/S144A	0.95 ± 0.03

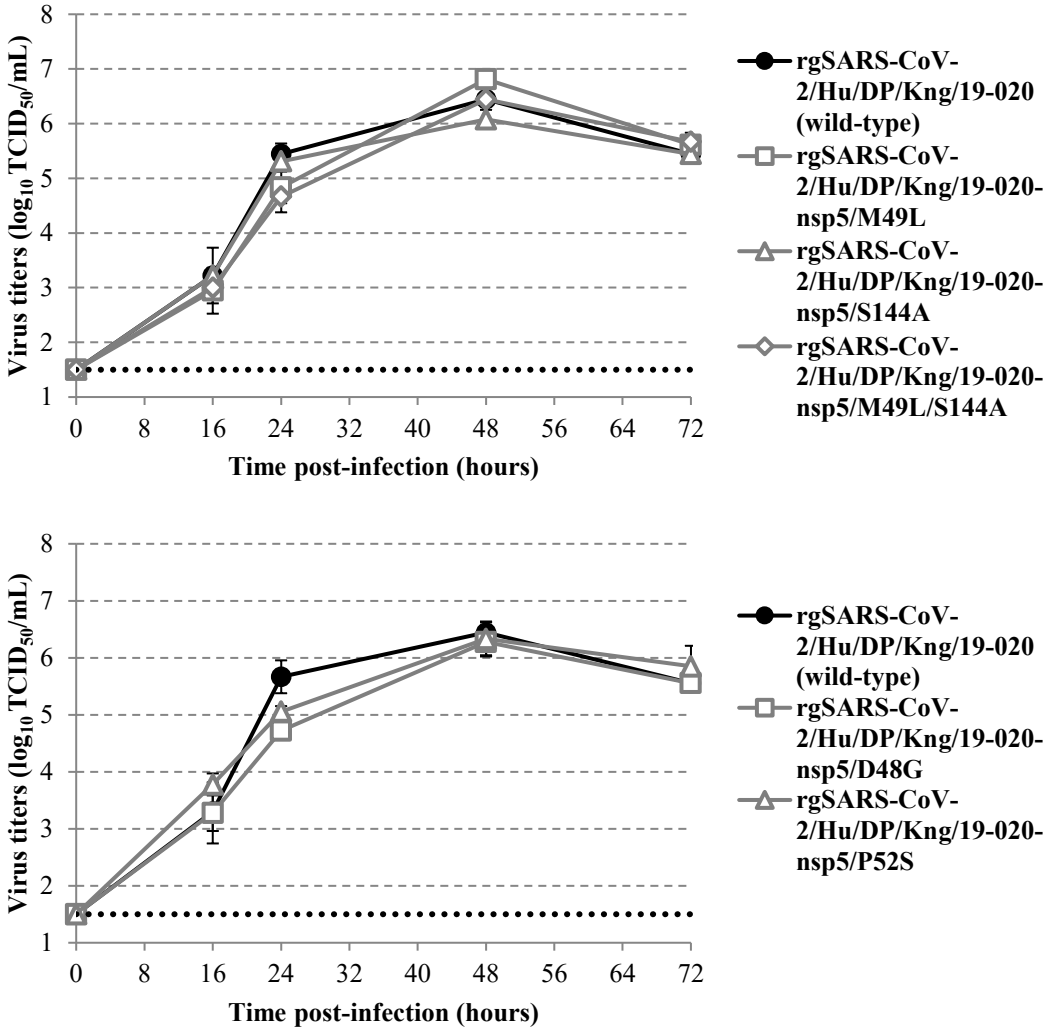
Fold change = EC_{50} value against each mutant strain / EC_{50} value against wild-type strain

Data are expressed as the mean ± SD of 3 independent experiments

a In the evaluation of PF-07321332, CP-100356 monohydrochloride (P-glycoprotein inhibitor) was added at the final concentration of 1 μmol/L.

b REGN-COV2: REGN antibody cocktail (REGN10933 and REGN10987)

図 2.6.2.2-1 VeroE6/TMPRSS2 細胞におけるリバースジェネティクス由来の SARS-CoV-2 nsp5 変異体の増殖性



$TCID_{50}$ = 50% tissue culture infectious dose
Each symbol represents the mean and SD of triplicate samples
Undetectable virus titers were defined as 1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL

表 2.6.2.2-9 野生型ウイルスに対するアミノ酸置換ウイルスの競合増殖性

Amino acid substitution in competitor	Conclusive Judgement of Competitive fitness of competitor against WT	Judgement for each set (mixture ratio in P0 sample, WT : competitor)	
		Ratio 1:1	Ratio 1:9
D48G	No clear difference	Better fitness /Competing	No difference /No difference
M49L	No difference	Competing /No difference	No difference /No difference
P52S	Having remarkably lesser fitness	Lesser fitness /Lesser fitness	Lesser fitness /Lesser fitness
S144A	No difference	No difference /No difference	No difference /No difference
M49L/S144A	Having lesser fitness	Lesser fitness /Lesser fitness	No difference /No difference

WT: wild type, competitor: amino acid substituted virus, P0: Passage 0

The competitive fitness of viruses with amino acid substitutions were determined for duplicate culture according to the criterion which were defined in S-217622-EB-183-N [Location in CTD 4.2.1.1-28].

表 2.6.2.2-10 VeroE6/TMPRSS2 細胞におけるリバースジェネティクス法により調製した SARS-CoV-2 nsp5 変異体に対するエンシトレルビルフマル酸，レムデシビルの抗ウイルス活性の Fold change

Strain	Fold change	
	Ensitrelvir fumaric acid	Remdesivir
rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/L87F	0.92	0.47
rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/T198I	1.5	0.72
rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/A234S	1.7	1.2
rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020-nsp5/H246Y	0.90	0.93

Fold change = EC_{50} value against each mutant strain / EC_{50} value against wild-type strain

2.6.2.2.1.7 抗 SARS-CoV-2 薬との併用による抗 SARS-CoV-2 効果

評価資料 4.2.1.1-30, 4.2.1.1-31, 4.2.1.1-32

概要表 2.6.3.2.30, 2.6.3.2.31, 2.6.3.2.32

VeroE6/TMPRSS2 細胞に SARS-CoV-2 デルタ株 (Pango lineage B.1.617.2: hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021 株) を感染させる in vitro モデルで，エンシトレルビルフマル酸と SARS-CoV-2 治療薬 (レムデシビル，REGN-COV2，ソトロビマブ，ベブテロビマブ又はチキサゲビマブ/シルガビマブ) を併用した際の抗 SARS-CoV-2 活性を評価した．また，VeroE6/TMPRSS2 細胞に組換え SARS-CoV-2 従来株 (Pango lineage A: rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020 株) を感染させる in vitro モデルで，エンシトレルビルフマル酸と EIDD-1931 又は PF-07321332 を併用した際の抗 SARS-CoV-2 活性を評価した．続いて Chou と Talalay の報告 [1] に倣い combination index (CI) を算出し，CI ≤ 0.8 を相乗，0.8 < CI < 1.2 を相加，1.2 ≤ CI を拮抗として併用効果を判定した．各薬剤の組み合わせについて 3 回ずつ検討を行った結果，エンシトレルビルフマル酸とレムデシビルを併用した際の CI は 1.11，1.06，1.03， REGN-COV2 を併用した際の CI は 0.913，0.742，

0.730，ソトロビマブを併用した際の CI は 0.874，0.971，0.828，ベブテロビマブを併用した際の CI は 1.04，0.938，0.992，チキサゲビマブ/シルガビマブを併用した際の CI は 1.18，1.19，1.04，EIDD-1931 を併用した際の CI は 1.07，1.19，1.12，エンシトレルビルフマル酸と PF-07321332 を併用した際の CI は 1.08，1.12，1.15 であった (表 2.6.2.2-11)．以上の結果から，エンシトレルビルフマル酸はレムデシビル，ソトロビマブ，ベブテロビマブ，又はチキサゲビマブ/シルガビマブ，EIDD-1931 又は PF-07321332 と併用した際には相加的な抗 SARS-CoV-2 活性を示し，REGN-COV2 と併用した際には相加から相乗的な抗 SARS-CoV-2 活性を示すことが示唆された．なお，併用効果評価時と同一条件で細胞障害性の評価も行ったが，細胞障害性は認められず，CC_{50} は算出されなかった．

表 2.6.2.2-11 エンシトレルビルフマル酸とレムデシビル，REGN-COV2，ソトロビマブ，ベブテロビマブ，チキサゲビマブ/シルガビマブ，EIDD-1931 又は PF-07321332 を併用したときの CI

Substance A + Substance B	Exp. No.	CI	combination effect
Ensitrelvir fumaric acid + Remdesivir	1	1.11	additive
	2	1.06	additive
	3	1.03	additive
Ensitrelvir fumaric acid + REGN-COV2	1	0.913	additive
	2	0.742	synergy
	3	0.730	synergy
Ensitrelvir fumaric acid + Sotrovimab	1	0.874	additive
	2	0.971	additive
	3	0.828	additive
Ensitrelvir fumaric acid + Bebtelovimab	1	1.04	additive
	2	0.938	additive
	3	0.992	additive
Ensitrelvir fumaric acid + Tixagevimab/Cilgavimab	1	1.18	additive
	2	1.19	additive
	3	1.04	additive
Ensitrelvir fumaric acid + EIDD-1931	1	1.07	additive
	2	1.19	additive
	3	1.12	additive
Ensitrelvir fumaric acid + PF-07321332	1	1.08	additive
	2	1.12	additive
	3	1.15	additive

2.6.2.2.2 In vivo 試験

2.6.2.2.2.1 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおけるエンシトレルビルフマル酸の PK/PD 解析

評価資料 4.2.1.1-33

概要表 2.6.3.2.33

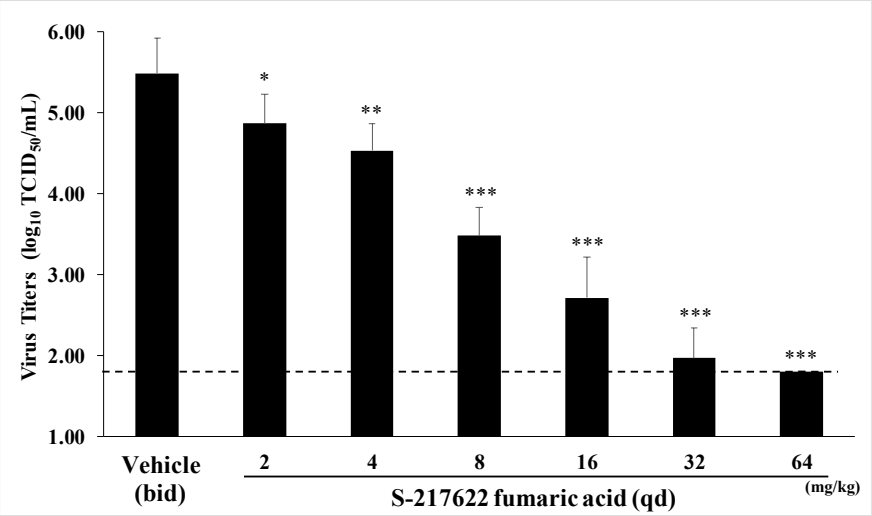
雌性 BALB/c マウスに SARS-CoV-2 ガンマ株 (Pango lineage P.1: hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株) を 1.00×10^4 50%組織細胞感染価 ($TCID_{50}$)/マウスで経鼻接種した直後より，エンシトレルビルフマル酸を 0 (媒体対照群: 0.5 w/v% メチルセルロース水溶液 [0.5% MC])，1，2，4，8，16 及び 32 mg/kg の用量で 12 時間ごとに bid の単日経口投与，0.5，1，2，4，8 及び 16 mg/kg の用量で 6 時間ごとに 1 日 4 回 (qid) の単日経口投与，又は 2，4，8，16，32 及び 64 mg/kg の用

量で 1 日 1 回 (qd) の単日経口投与を実施し，初回投与から 24 時間後の肺内ウイルス力価を測定した.

エンシトレルビルフマル酸投与群では，qd (図 2.6.2.2-2)，bid (図 2.6.2.2-3) 及び qid (図 2.6.2.2-4) のいずれの投与においても，用量依存的な肺内ウイルス力価の低下が認められ，マウスでのウイルス複製を阻害することが示唆された．また，同感染モデルにエンシトレルビルフマル酸を 2，8，16，32 及び 64 mg/kg の用量で単回経口投与したときのエンシトレルビルの血漿中濃度は，用量の増加に伴い増大した (表 2.6.2.2-12)．PK/PD 解析において，各種 PK パラメータを PA-EC_{50} で除した値 (初回投与後の C_{max}/PA-EC_{50}，$AUC_{0\text{-}24hr}$/PA-EC_{50}，初回投与から 24 時間後の血漿中濃度 [C_{24hr}]/PA-EC_{50})，又は 1 × PA-EC_{50} を超える血漿中濃度を維持する時間 ($Time_{High}$ [1 × PA-EC_{50}]) と初回投与から 24 時間後の肺内ウイルス力価の低下量との関係性を解析した. その結果, 初回投与から 24 時間後の肺内ウイルス力価の低下に対する, C_{max}/PA-EC_{50}, $AUC_{0\text{-}24hr}$/PA-EC_{50}，$Time_{High}$ (1 × PA-EC_{50}) 及び C_{24hr}/PA-EC_{50} の決定係数 (r^2) はそれぞれ 0.856, 0.793，0.266 及び 0.114 であった.

以上の結果から，マウスにおいて感染直後にエンシトレルビルフマル酸を投与開始したときの，初回投与から 24 時間後の肺内ウイルス力価の低下量と良好に相関する PK パラメータは，C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ であった.

図 2.6.2.2-2 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染直後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 1 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響



Mice were orally administered (10 mL/kg) with ensitrelvir fumaric acid or vehicle (0.5% MC). The first administration was performed immediately after virus infection.

The administration doses are indicated as free form.

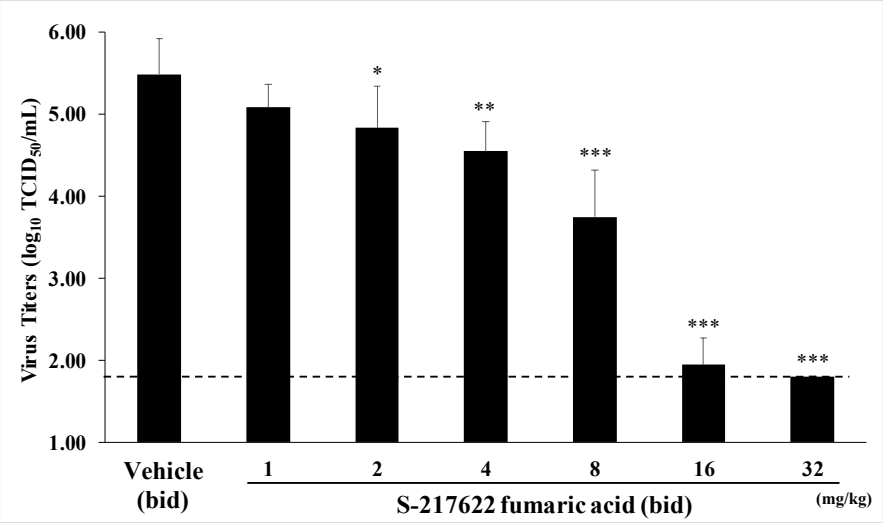
Each point represents the mean ± SD of 5 to 10 mice.

Broken line represents the lower limit of quantification (1.80 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL).

The following p-values were calculated by Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle.

S-217622 in the figure indicates ensitrelvir.

図 2.6.2.2-3 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染直後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 2 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響



Mice were orally administered (10 mL/kg) with ensitrelvir fumaric acid or vehicle (0.5% MC). The first administration was performed immediately after virus infection.

The administration doses are indicated as free form.

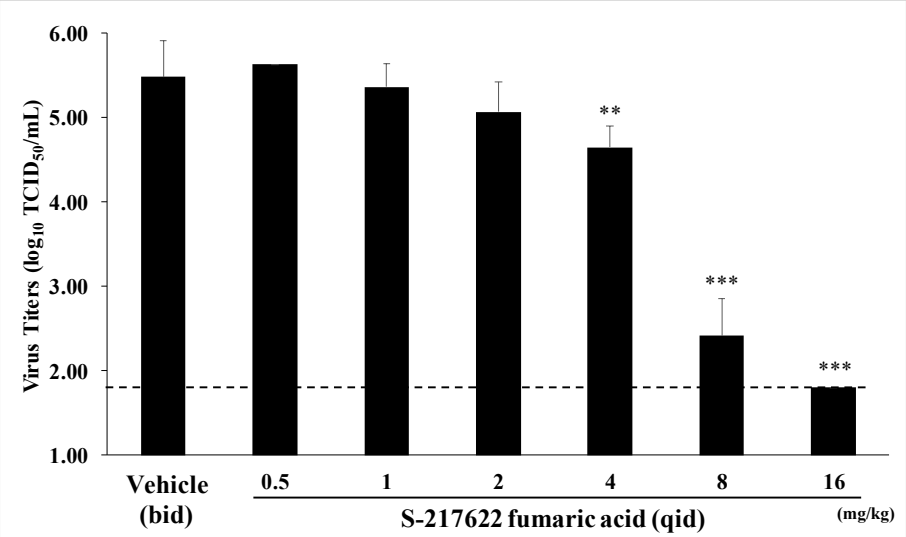
Each point represents the mean ± SD of 5 to 10 mice.

Broken line represents the lower limit of quantification (1.80 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL).

The following p-values were calculated by Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle.

S-217622 in the figure indicates ensitrelvir.

図 2.6.2.2-4　　SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染直後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 4 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響



Mice were orally administered (10 mL/kg) with ensitrelvir fumaric acid or vehicle (0.5% MC). The first administration was performed immediately after virus infection.

The administration doses are indicated as free form.

Each point represents the mean ± SD of 5 to 10 mice.

Broken line represents the lower limit of quantification (1.80 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL).

The following p-values were calculated by Dunnett's test. ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle.

S-217622 in the figure indicates ensitrelvir.

表 2.6.2.2-12　　SARS-CoV-2 感染マウスにおけるエンシトレルビルフマル酸単回経口投与後のエンシトレルビルの血漿中濃度

Time	Plasma concentration of ensitrelvir (ng/mL)					
(hr)	2 mg/kg	8 mg/kg	16 mg/kg	32 mg/kg	64 mg/kg	
0.5	3830 ± 450	16500 ± 2800	35500 ± 5900	57600 ± 22900	150000 ± 28000	
1	5040 ± 860	16600 ± 3000	38800 ± 4500	72400 ± 25200	159000 ± 27000	
2	7470 ± 1120	16700 ± 2000	37300 ± 5500	64900 ± 18400	155000 ± 13000	
4	4300 ± 420	13400 ± 1600	26400 ± 6700	57900 ± 17500	138000 ± 14000	
6	3060 ± 320	8740 ± 1120	18500 ± 2200	44000 ± 10400	107000 ± 18000	
12	641 ± 163	1700 ± 620	3680 ± 940	11200 ± 3400	40700 ± 16100	
18	58.7 ± 65.4	280 ± 374	303 ± 114	786 ± 369	4500 ± 3910	
24	6.02 ± 1.76	135 ± 213	75.8 ± 17.1	210 ± 67	1290 ± 850	

Mice were administrated with ensitrelvir fumaric acid immediately after infection with hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 strain.

Data represent the mean and SD of 3 or 4 mice.

2.6.2.2.2.2　　SARS-CoV-2 感染マウスにおけるエンシトレルビルフマル酸遅延投与の PK/PD 解析

評価資料 4.2.1.1-34

概要表 2.6.3.2.34

雌性 BALB/c マウスに SARS-CoV-2 ガンマ株 (Pango lineage P.1: hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株) を 1.00×10^4 $TCID_{50}$/マウスで経鼻接種した 24 時間後より，エンシトレルビルフマル酸を 0

(媒体対照群: 0.5% MC)，8，16，32 及び 64 mg/kg の用量で 12 時間ごとに bid の 2 日間経口投与，8，16，32 及び 64 mg/kg の用量で 8 時間ごとに 1 日 3回 (tid) の 2 日間経口投与，16，32 及び 64 mg/kg の用量で qd の 2 日間経口投与，又は 32 及び 64 mg/kg の用量で単回経口投与を実施し，初回投与から 24 時間後及び 48 時間後の肺内ウイルス力価を測定した.

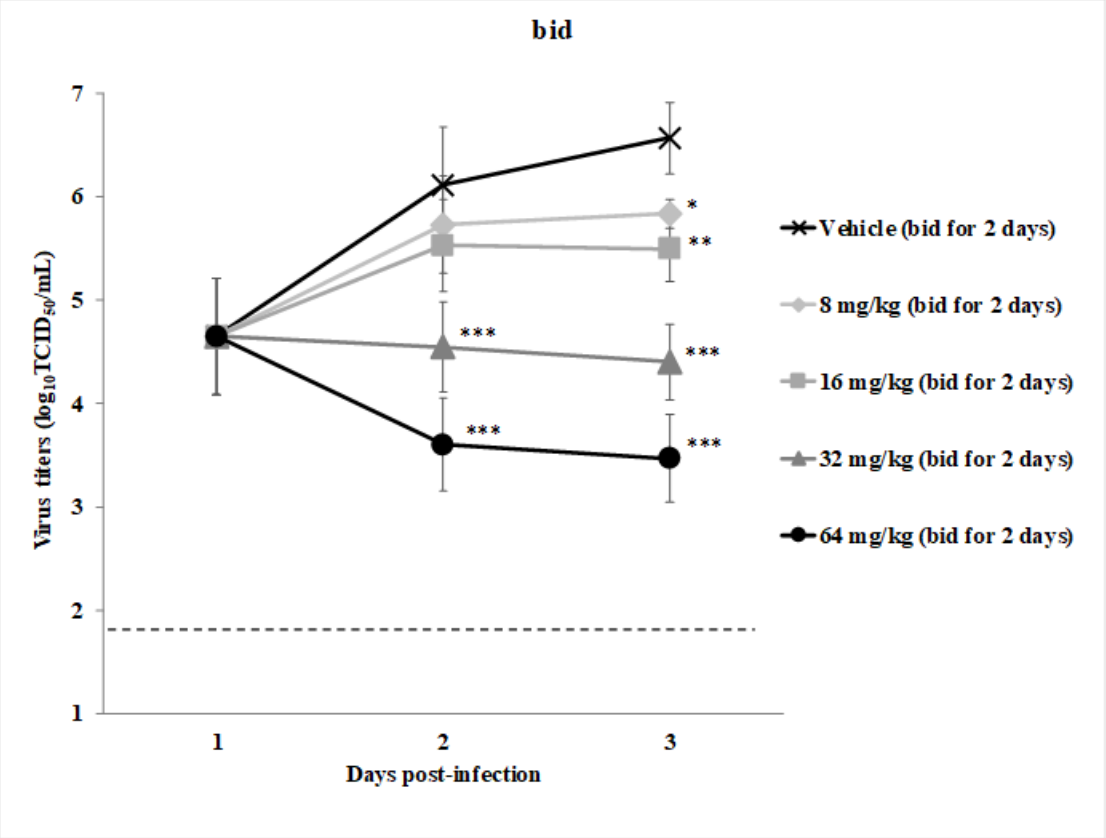
エンシトレルビルフマル酸投与群では，用量依存的な肺内ウイルス力価の低下が認められた(図 2.6.2.2-5, 図 2.6.2.2-6, 図 2.6.2.2-7). 単日投与群を除く全てのエンシトレルビルフマル酸投与群において，持続的な肺内ウイルス力価の抑制効果が認められ，初回投与 48 時間後における肺内ウイルス力価は，媒体対照群よりも有意に低値を示した.

PK/PD 解析において，C_{max}/PA-EC_{50}，$AUC_{0\text{-}48hr}$/PA-EC_{50}，C_{48hr}/PA-EC_{50} 又は 1 × PA-EC_{50}，3 × PA-EC_{50}，5 × PA-EC_{50}，10 × PA-EC_{50} を超える血漿中濃度を維持する時間 ($Time_{High}$ [1 × PA-EC_{50}]，$Time_{High}$ [3 × PA-EC_{50}]，$Time_{High}$ [5 × PA-EC_{50}]，$Time_{High}$ [10 × PA-EC_{50}])と初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価の低下量との関係性を解析した.

その結果, 初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価の低下に対する, $Time_{High}$ (10 × PA-EC_{50}), $AUC_{0\text{-}48hr}$/PA-EC_{50}，C_{48hr}/PA-EC_{50}，$Time_{High}$ (5 × PA-EC_{50})，$Time_{High}$ (3 × PA-EC_{50})，C_{max}/PA-EC_{50} 及び $Time_{High}$ (1 × PA-EC_{50}) の r^2 はそれぞれ 0.775，0.735，0.734，0.647，0.499，0.311 及び 0.310 であった.

以上の結果から, マウスにおいて感染 24 時間後にエンシトレルビルフマル酸を投与開始したときの，初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価の低下量と良好に相関する PK パラメータは，$AUC_{0\text{-}48hr}$，C_{48hr} 及び $Time_{High}$ (5 × PA-EC_{50}，10 × PA-EC_{50}) であった.

図 2.6.2.2-5 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染 24 時間後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 2 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響



Mice were orally administered (10 mL/kg) with ensitrelvir fumaric acid or vehicle (0.5 % MC). The first administration was performed 24 hours after virus infection.

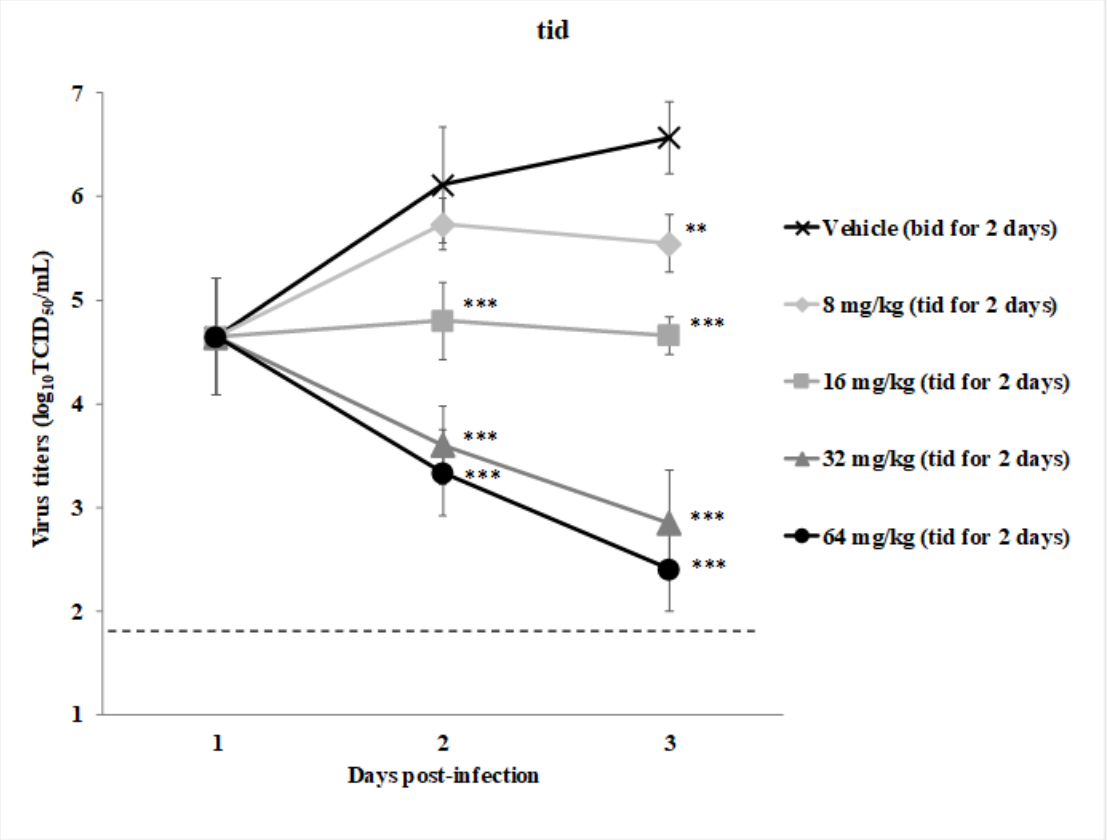
The administration doses are indicated as free form.

Each point represents the mean ± SD of 5 mice.

Broken line represents the lower limit of quantification (1.80 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL).

The following p-values were calculated by Dunnett's method. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-6 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染 24 時間後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 3 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響



Mice were orally administered (10 mL/kg) with ensitrelvir fumaric acid or vehicle (0.5% MC). The first administration was performed 24 hours after virus infection.

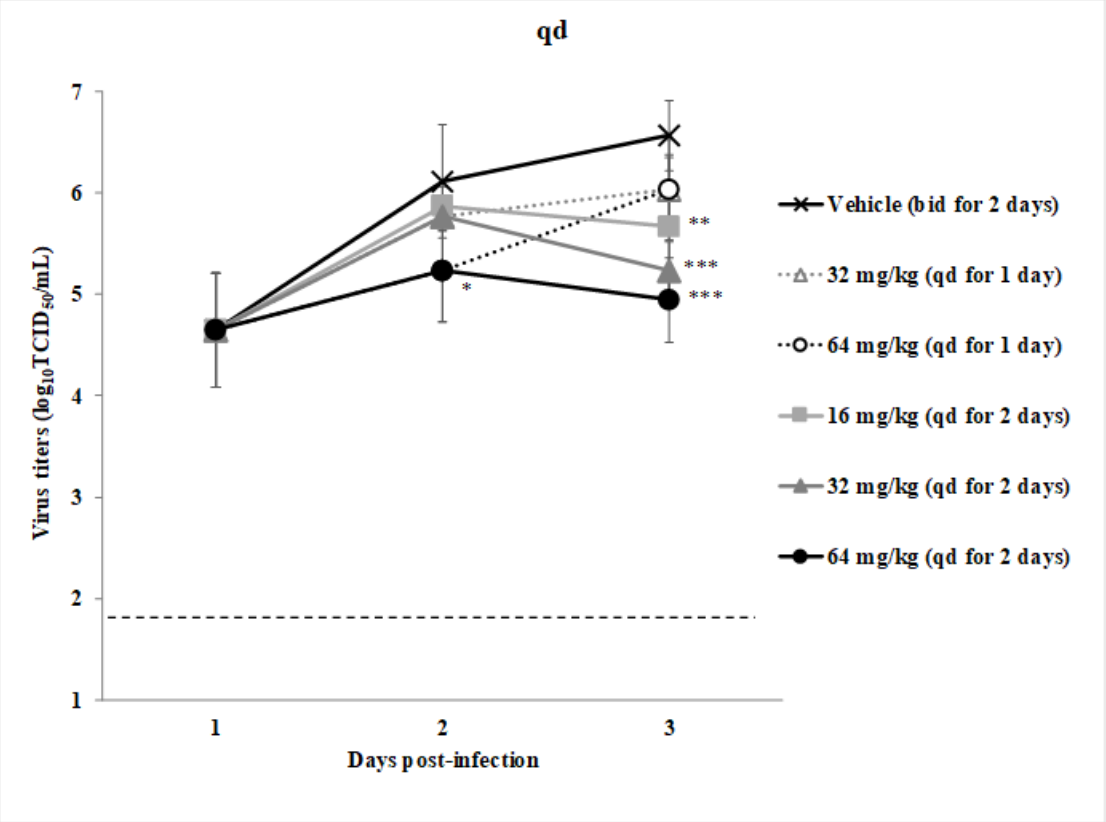
The administration doses are indicated as free form.

Each point represents the mean ± SD of 5 mice.

Broken line represents the lower limit of quantification (1.80 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL).

The following p-values were calculated by Dunnett's method. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-7 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染 24 時間後よりエンシトレルビルフマル酸を 1 日 1 回投与したときの肺内ウイルス力価への影響



Mice were orally administered (10 mL/kg) with ensitrelvir fumaric acid or vehicle (0.5% MC). The first administration was performed 24 hours after virus infection.

The administration doses are indicated as free form.

Each point represents the mean ± SD of 5 mice.

Broken line represents the lower limit of quantification (1.80 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL).

The following p-values were calculated by Dunnett's method. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle.

2.6.2.2.2.3 SARS-CoV-2 感染マウスにおけるエンシトレルビルフマル酸遅延投与による治療効果

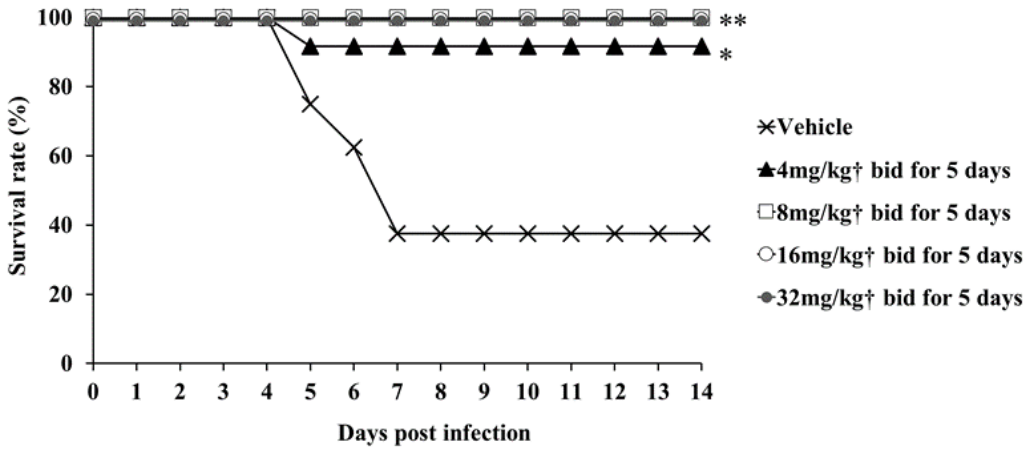
評価資料 4.2.1.1-35

概要表 2.6.3.2.35

雌性 BALB/c マウスに SARS-CoV-2 MA-P10 株 (mouse-adapted hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 株) を 1.00×10^3 $TCID_{50}$/マウスで経鼻接種した 24 時間後より，エンシトレルビルフマル酸を 0 (媒体対照群: 0.5% MC)，4，8，16 及び 32 mg/kg の用量で 12 時間ごとに bid の 5 日間経口投与を実施し，感染から 14 日間の体重変化率 (感染当日の体重を 100%としたときの，感染後の体重変化率)，生存率及び生存期間を確認した．感染 14 日後における生存率は，媒体対照群では 37.5%，4 mg/kg 投与群では 91.7%，8，16 及び 32 mg/kg 投与群では 100%であり，エンシトレルビルフマル酸投与群では，いずれの投与量においても生存率が改善し，媒体対照群と比べて有意に生存期間が延長した (図 2.6.2.2-8). さらに，エンシトレルビルフマル酸投与群の感染 5 日後までの体重変化率は，媒体対照群と比較して，用量依存的に抑制された (図 2.6.2.2-9).

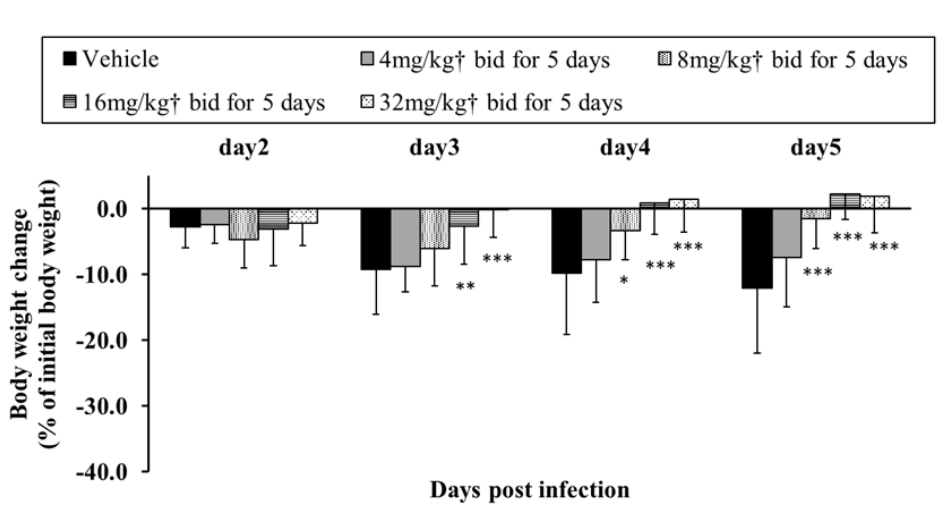
以上の結果から，エンシトレルビルフマル酸はマウスにおいて SARS-CoV-2 感染に伴う病態進展を抑制するものと考えられる．

図 2.6.2.2-8 エンシトレルビルフマル酸を感染 24 時間後より 1 日 2 回投与したときの SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおける感染後 14 日間の生存率



Mice were orally administered (10 mL/kg) with ensitrelvir fumaric acid or vehicle (0.5 w/v% MC).
The first administration was performed 24 hours after virus infection.
* and ** denote respectively P < 0.05 and P < 0.01 vs vehicle using log-rank test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure).
†; the administration dose as free form.

図 2.6.2.2-9 エンシトレルビルフマル酸を感染 24 時間後より 1 日 2 回投与したときの SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおける感染後 5 日間の体重変化率



Mice were orally administered (10 mL/kg) with ensitrelvir fumaric acid or vehicle (0.5 w/v% MC). The first administration was performed 24 hours after virus infection.
*, ** and *** denote respectively P<0.05, P < 0.01, and P < 0.001 vs vehicle, using ANOVA-test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure).
†; the administration dose as free form.

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 各種受容体，イオンチャネル及びトランスポーター並びに酵素に対する作用

評価資料 4.2.1.2-01

概要表 2.6.3.3.1

エンシトレルビルフマル酸の選択性を確認するために，一次評価として，108 種の分子標的 (49種の受容体，19種のイオンチャネル，6 種のトランスポーター，31 種の酵素及び 3 種のキナーゼ) の各放射性リガンド結合又は酵素活性の in vitro 阻害アッセイを実施した．これらのアッセイは，100 µmol/L (53.2 µg/mL) のエンシトレルビルフマル酸で実施した．100 µmol/L (53.2 µg/mL) の濃度でエンシトレルビルフマル酸が 50%以上の特異的結合や酵素活性阻害を認められた分子標的は，PDE4A1A，PDE4B1，PDE4C1，PDE4D2，PDE7A，PDE7B，コレシストキニン (CCK) 2 受容体，ニコチン性アセチルコリン (ACh) 受容体サブユニット α1 及びアデノシントランスポーターの計 9 種であり，これらの分子標的におけるエンシトレルビルフマル酸の IC_{50} を確認するために，より包括的な二次評価を実施した．二次評価では，上記 9 種にペプチダーゼ 10 種 (angiotensin converting enzyme，caspase 2，chymotrypsin，cathepsin B，cathepsin D，cathepsin G，cathepsin L，neutrophil elastase 2，HIV-1 protease and thrombin) を加えた計 19 種のターゲットに対し，それぞれ 30，100，300 nmol/L，1，3，10，30，100 µmol/L (53.2 µg/mL) の 8 濃度で実施した. その結果, エンシトレルビルフマル酸は, アデノシントランスポーターのアデノシン取り込み活性に対して, 1.43 µmol/L の IC_{50} を示した. また, PDE4A1A, PDE4B1, PDE4C1 及び PDE4D2 の酵素活性に対して，それぞれ 63.2，69.1，75.7 及び 73.4 µmol/L の IC_{50} を示した．上記以外の PDE7A，PDE7B，10 種のペプチダーゼに対する酵素阻害活性，CCK2 受容体に対する機能阻害活性及びニコチン性 ACh 受容体サブユニット α1 に対する結合活性の IC_{50} は，> 100 µmol/L であった．

2.6.2.3.2 ヒト初代培養細胞に対する細胞毒性

評価資料 4.2.1.2-02

概要表 2.6.3.3.2

エンシトレルビルフマル酸の細胞毒性について，増殖期 (増殖能を有するサブコンフルエント状態) 及び非増殖期 (増殖はなく，ほぼコンフルエント状態) のヒト初代培養細胞を用いて検討した (表 2.6.2.3-1).

増殖期又は非増殖期の初代培養細胞 (ヒト肝細胞，正常ヒト腎上皮混合細胞及びヒト末梢血 CD4+T 細胞) を，エンシトレルビルフマル酸 (評価濃度：0.29～72 µg/mL) を添加した培地で 48時間培養した．細胞中 ATP 量に基づき，細胞障害性を評価し，72 µg/mL までに細胞障害性を示した場合は CC_{50} を算出した.

エンシトレルビルフマル酸はヒト肝細胞及びヒト末梢血 CD4+T 細胞の増殖期及び非増殖期，並びに正常ヒト腎上皮混合細胞の非増殖期に対して 72 µg/mL まで細胞障害性を示さなかった．正常ヒト腎上皮混合細胞の増殖期では，72 µg/mL の濃度で細胞障害が認められたものの，50%未満の変化であり，CC_{50} は > 72 µg/mL であった.

以上の結果から，エンシトレルビルフマル酸のヒト初代培養細胞における CC_{50} は，72 µg/mL

(135 μmol/L) を超える濃度と推定された.

表 2.6.2.3-1 ヒト初代培養細胞に対するエンシトレルビルフマル酸の細胞毒性

Cell Lines	CC_{50} (μg/mL)	
	Ensitrelvir fumaric acid	
	Proliferative Condition	Near Confluence Condition
Human Hepatocytes	NC	NC
Normal Human Mixed Renal Epithelial Cells	> 72	NC
Human Peripheral Blood CD4+ T cells	NC	NC

The entire testing was performed in duplicate.
NC = CC_{50} value not calculable. Concentration-response curve showed less than 25% effect at the 72 μg/mL.

2.6.2.3.3 ヒト各種組織由来株化細胞に対する細胞毒性

評価資料 4.2.1.2-03

概要表 2.6.3.3.3

エンシトレルビルフマル酸の細胞毒性について，増殖期 (増殖能を有するサブコンフルエント状態) 及び非増殖期 (増殖はなく，ほぼコンフルエント状態) のヒト細胞株を複数種用いて検討した (表 2.6.2.3-2).

増殖期又は非増殖期のヒト組織由来株化細胞 (HepG2 細胞 [ヒト肝細胞癌細胞株]，HK-2 細胞 [ヒト腎糸球体細胞株]，HEK293 細胞 [ヒト胎児腎臓細胞]，SH-SY-5Y 細胞 [ヒト神経芽腫細胞株]，SK-N-SH 細胞 [ヒト神経芽腫細胞株]，Jurkat 細胞 [ヒト T 細胞白血病細胞株]，E006AA-hT細胞 [ヒト前立腺癌細胞株]，HUVEC 細胞 [ヒト血管内皮細胞株] 及び MRC-5 細胞 [ヒト肺線維芽細胞株]) を，エンシトレルビルフマル酸 (評価濃度：0.29～72 μg/mL) を添加した培地で 48時間培養した．細胞中 ATP 量に基づき，細胞障害性を評価し，72 μg/mL までに細胞障害性を示した場合は CC_{50} を算出した.

エンシトレルビルフマル酸は Jurkat 細胞以外に対して 72 μg/mL まで細胞障害性を示さなかった．Jurkat 細胞では 72 μg/mL の濃度で細胞障害が認められたものの，50%未満の変化であり，CC_{50} は，増殖期，非増殖期共に > 72 μg/mL であった.

以上の結果から，エンシトレルビルフマル酸のヒト組織由来細胞株における CC_{50} は 72 μg/mL (135 μmol/L) を超える濃度と推定された.

表 2.6.2.3-2 ヒト各種組織由来株化細胞に対するエンシトレルビルフマル酸の細胞毒性

Cell Lines	CC_{50} (μg/mL)	
	Ensitrelvir fumaric acid	
	Proliferative Condition	Near Confluence Condition
E006AA-hT	NC	NC
HEK293	NC	NC
HepG2	NC	NC
HK-2	NC	NC
HUVEC	NC	NC
Jurkat	> 72	> 72
MRC-5	NC	NC
SH-SY-5Y	NC	NC
SK-N-SH	NC	NC

The entire testing was performed in duplicate.
NC = CC_{50} value not calculable. Concentration-response curve showed less than 25% effect at the 72 μg/mL.

2.6.2.3.4 ヒト細胞に対するミトコンドリア毒性

評価資料 4.2.1.2-04

概要表 2.6.3.3.4

エンシトレルビルフマル酸のミトコンドリア毒性を，HepG2 細胞を用いてグルコース又はガラクトース含有培地で検討した．

HepG2 細胞は増殖活性が高く，通常解糖系を介して細胞内 ATP を産生するため，高濃度のグルコースを含む培地ではミトコンドリア毒性に抵抗性を示す．しかし，培地中のグルコースをガラクトースに置換すると，解糖系を介した ATP の産生が制限されるため，細胞はミトコンドリア毒性物質に感受性を示すようになる [2]．この性質を利用し，グルコース又はガラクトースを含有する培地で培養した細胞に対する被験物質の細胞毒性を比較することで，ミトコンドリア毒性の有無を評価した．

HepG2 細胞をエンシトレルビルフマル酸 (評価濃度 : 0.096～300 μg/mL) を添加したグルコース又はガラクトースを含有した培地を用いて，2 日間 (短期曝露) 又は 14 日間 (長期曝露) 培養した．曝露後の培養細胞中 ATP 量に基づき，CC_{50} を算出した．

エンシトレルビルフマル酸曝露下で 2 日間培養した際の CC_{50} は，グルコース含有培地で 287 μg/mL，ガラクトース含有培地で 294 μg/mL であり，両培養条件下で細胞障害性に違いは認められなかった．

エンシトレルビルフマル酸曝露下で 14 日間培養した際の CC_{50} はグルコース含有培地で 100 μg/mL，ガラクトース含有培地で 97.9 μg/mL であり，両培養条件下で細胞障害性に違いは認められなかった．

以上の結果より，本試験条件下では短期曝露及び長期曝露のいずれの条件においても，エンシトレルビルフマル酸は HepG2 細胞に対してミトコンドリア毒性を示さないと判断した．

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系

2.6.2.4.1.1 ラットの中枢神経系に対する作用

評価資料 4.2.1.3-01

概要表 2.6.3.4

Sprague Dawley 系雄性ラット (各群 6 例) に 0 (対照群), 20, 100 又は 1000 mg/kg のエンシトレルビルフマル酸を単回経口投与し，投与前，投与後 1，2，4，8 及び 24 時間における一般症状及び神経行動学的機能について，機能観察総合評価法を用いて評価した．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．

1000 mg/kg までの用量で投与後 24 時間まで中枢神経系への影響を示唆する一般症状及び神経行動学的機能に影響は認められなかった．

1000 mg/kg 投与群で，投与後 1 時間までの尿量及び投与後 8 時間までの糞量及び尿量の減少が認められた．その他の一般症状及び神経行動学的機能に異常が認められていないことから，これらの変化は，中枢神経への影響を示唆する変化ではないと判断した．

以上の結果より，エンシトレルビルフマル酸はラットへの単回経口投与により，1000 mg/kg の用量まで中枢神経系に影響を及ぼさないと判断した．

2.6.2.4.2 心血管系・呼吸系

2.6.2.4.2.1 hERG 導入細胞におけるカリウム電流に対する作用

評価資料 4.2.1.3-02

概要表 2.6.3.4

hERG チャネルを発現させたチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (各濃度 5 例) にエンシトレルビルフマル酸を 0 (対照群), 10, 30 又は 100 µmol/L (それぞれ 0, 5.32, 16.0 又は 53.2 µg/mL) の濃度で適用し，ホールセルパッチクランプ法を用いて hERG 電流を測定した．また，適用前値に対する抑制率 (対照群の抑制率を基に補正) を算出した．対照群には媒体 (0.5% ジメチルスルホキシド) を適用した．

エンシトレルビルフマル酸は 10，30 及び 100 µmol/L の濃度でそれぞれ 9%，16%及び 39%の hERG 電流抑制率を示した．以上の結果，エンシトレルビルフマル酸の hERG 電流に対する IC_{50} は 100 µmol/L (53.2 µg/mL) を超える濃度と推定された．

2.6.2.4.2.2 In vivo におけるサルの血圧，心拍数，心電図及び呼吸に対する作用

評価資料 4.2.1.3-03

概要表 2.6.3.4

雄性カニクイザル (4 例) に 0 (対照群), 10, 50 又は 150 mg/kg のエンシトレルビルフマル酸を 7 日間の投与間隔で経口投与し，投与前並びに投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間における血圧，心拍数及び心電図 (PR 間隔，QRS 時間，QT 間隔及び補正 QT 間隔 [QTc]) についてテレメトリー法を用いて評価した．また，50 及び 150 mg/kg 投与時には，投与前並びに投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間における呼吸数をテレメトリー法を用いて評価し，血液ガスパラメータ

(動脈血 pH，動脈血酸素分圧，動脈血二酸化炭素分圧及びヘモグロビン酸素飽和度) を評価するために，投与前並びに投与後 0.5，2，8 及び 24 時間に採血した．加えて，エンシトレルビルのトキシコキネティクス (TK) 評価のため，投与前並びに投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間における血漿中薬物濃度を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) で測定した．対照群には媒体 (0.5%MC) を投与した．

エンシトレルビルフマル酸を 10，50 又は 150 mg/kg 投与したときの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ を表 2.6.2.4-1 に示した．

150 mg/kg までの用量で，血圧，心電図，呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった．心拍数に関して，10 mg/kg の用量で影響は認められなかったが，50 及び 150 mg/kg の用量で，各 3/4 例において軽度な増加が認められた．変化が認められた個体の同解析時点における変化率 (対媒体投与時) は 50 及び 150 mg/kg で最大+28%であり，用量間で同程度であった．

以上の結果，エンシトレルビルフマル酸はサルへの単回経口投与により，心血管系に対して 10 mg/kg の用量まで，呼吸系に対して 150 mg/kg の用量まで影響を及ぼさないと判断した．

表 2.6.2.4-1 サルの血圧，心拍数，心電図及び呼吸に対する作用に関する試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ

TK parameters of ensitrelvir	Dose (mg/kg)		
	10	50	150
C_{max} (μg/mL)	43.8	141	326
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	732	2760	6190

$AUC_{0\text{-}24hr}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours post-dose;
C_{max} = maximum plasma concentration
Data are expressed as the mean values of 4 monkeys.

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし．

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

2.6.2.6.1.1 作用機序

エンシトレルビルフマル酸の標的酵素である SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼは，SARS-CoV-2 遺伝子から翻訳されたポリタンパク質のプロセシングを行うことでウイルス複製を進行させる．そのため，同酵素は SARS-CoV-2 ウイルスの複製に必須と考えられている．SARS-CoV-2 が細胞に侵入すると，ウイルス RNA を鋳型にタンパク質が翻訳され，このうち非構造タンパク質はポリタンパク質として翻訳される．その後，このポリタンパク質は，自身に含まれるパパイン様プロテアーゼ，3CL プロテアーゼによるプロセシングを受け，ウイルスの複製や転写に必須である RNA 依存性 RNA ポリメラーゼやヘリカーゼ又は 3CL プロテアーゼそのもの，といったそれぞれ異なる機能を発揮する非構造タンパク質となる [3].

SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼタンパク質を用いた阻害活性の検討から，エンシトレルビル

フマル酸が SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ阻害活性を有することが示された．また，N 末端側から 15 番目のグリシンがセリンに置換 (G15S), N 末端側から 21 番目のトレオニンがイソロイシンに置換 (T21I)，N 末端側から 89 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換 (L89F)，N 末端側から 90 番目のリシンがアルギニンに置換 (K90R)，N 末端側から 108 番目のプロリンがセリンに置換 (P108S), N 末端側から 132 番目のプロリンがヒスチジンに置換 (P132H), N 末端側から 24 番目のトレオニンがイソロイシンに置換 (T24I), N 末端側から 88 番目のリシンがアルギニンに置換 (K88R), N 末端側から 193 番目のアラニンがバリンに置換 (A193V), N 末端側から 246 番目のヒスチジンがチロシンに置換 (H246Y), 及び N 末端側から 255 番目のアラニンがバリンに置換 (A255V) した SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼに対しても, エンシトレルビルフマル酸は wild-type と同等の酵素阻害活性を示し，IC_{50} は 0.0080～0.0150 μmol/L であった．

2.6.2.6.1.2 In vitro 活性

SARS-CoV-2 易感染性の細胞株である VeroE6/TMPRSS2 細胞及び HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞を用いた in vitro 試験において, 従来株 (Pango lineage A: hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 株), スパイクタンパク質に変異が認められている複数の SARS-CoV-2 臨床分離株 (アルファ株 [Pango lineage B.1.1.7: hCoV-19/Japan/QK002/2020 株， hCoV-19/Japan/QHN001/2020 株， hCoV-19/Japan/QHN002/2020 株]，ベータ株 [Pango lineage B.1.351: hCoV-19/Japan/TY8-612/2021 株]，ガンマ株 [Pango lineage P.1: hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株，hCoV-19/Japan/TY7-503/2021 株] ，デルタ株 [Pango lineage B.1.617.2: hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021 株]，シータ株 [Pango lineage P.3: hCoV-19/Japan/TY28-444/2021 株]，ラムダ株 [Pango lineage C.37: hCoV-19/Japan/TY33-456/2021 株]，ミュー株 [Pango lineage B.1.621: hCoV-19/Japan/TY26-717/2021 株] 及びオミクロン株 [Pango lineage B.1.1.529: hCoV-19/Japan/TY38-873/2021 株, hCoV-19/Japan/TY38-871/2021 株, hCoV-19/Japan/TY40-385/2022 株， hCoV-19/Japan/TY41-721/2022 株， hCoV-19/Japan/TY41-716/2022 株， hCoV-19/Japan/TY41-703/2022 株， hCoV-19/Japan/TY41-763/2022 株， hCoV-19/Japan/TY41-704/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-702/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-820/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-828/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-796/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-832/2022 株， hCoV-19/Japan/TY41-795/2022 株， hCoV-19/Japan/23-018/2022 株， hCoV-19/Japan/TY41-951/2023 株， hCoV-19/Japan/TY41-984/2023 株， hCoV-19/Japan/TY41-831/2022 株， hCoV-19/Japan/TY41-686/2022 株]) 並びに従来株を起源としたマウス馴化株 (SARS-CoV-2 MA-P10 株 [mouse-adapted hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 株]) に対してエンシトレルビルフマル酸は抗ウイルス活性を示した. 臨床分離株に対する EC_{50} は VeroE6/TMPRSS2 細胞では 0.22～0.99 μmol/L, HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞では 0.026～0.064 μmol/L であった．マウス馴化株に対するエンシトレルビルフマル酸の EC_{50} は，VeroE6/TMPRSS2 細胞では 0.12 μmol/L であった．VeroE6/TMPRSS2 細胞及び HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞に対する CC_{50} は > 100 μmol/L 及び 55 μmol/L であった．以上の結果より，エンシトレルビルフマル酸はスパイクタンパク質に変異が認められている複数の臨床分離株及びマウス馴化株に対して抗 SARS-CoV-2 活性を有し，臨床分離株及びマウス馴化株に対する感受性の違いは株間で小さいこと，並びに細胞障害を起こす濃度より極めて低い濃度で抗 SARS-CoV-2 活性を有することが示された．また，ヒト鼻腔あ

るいは気管支上皮由来細胞の MucilAir™に SARS-CoV-2 臨床分離株 (デルタ株 [Pango lineage B.1.617.2: hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021 株]，オミクロン株 [Pango lineage B.1.1.529: hCoV-19/Japan/TY38-873/2021 株，hCoV-19/Japan/TY41-702/2022 株]) を感染させたときの，エンシトレルビルフマル酸の EC_{50}，EC_{90}，EC_{99} 及び $EC_{99.9}$ は 0.0114 ～0.127，0.0514～0.195，0.121～0.335 及び 0.227～0.373 μmol/L を示し，hAEC においても抗 SARS-CoV-2 活性を有することが示された．加えてエンシトレルビルフマル酸はレムデシビル，ソトロビマブ，ベブテロビマブ，チキサゲビマブ/シルガビマブ，EIDD-1931 又は PF-07321332 と併用することにより相加的な，また REGN-COV2 と併用することにより相加から相乗的なウイルス増殖抑制効果を示した．

エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性に対するヒト血清及びマウス血清の影響を検討した結果，血清添加による抗 SARS-CoV-2 活性の potency shift がみられ，100%ヒト血清及び 100%マウス血清存在下でのエンシトレルビルフマル酸の推定の protein-adjusted EC_{50} (PA-EC_{50}) はそれぞれ 3.02 μmol/L 及び 3.93 μmol/L であり，血清非存在下のときの抗 SARS-CoV-2 活性と比較すると，potency shift はどちらも 6 倍であった．以上の結果より，エンシトレルビルフマル酸では血清による抗 SARS-CoV-2 活性への影響はヒト，マウス血清で同程度であることが示された．

2.6.2.6.1.3 In vivo 活性

In vivo 評価では，SARS-CoV-2 ガンマ株 (Pango lineage P1: hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株) を経鼻接種したマウス感染モデルを用いて，感染直後又は感染 24 時間後にエンシトレルビルフマル酸を投与開始した際の抗ウイルス活性を肺内ウイルス力価を指標に検討した．その結果，感染直後及び感染 24 時間後に投与開始したいずれの場合でも，用量依存的に肺内ウイルス力価の低下が認められ，エンシトレルビルフマル酸はマウス感染モデルにおいてウイルス複製を阻害すると考えられた．また，重篤な新型コロナウイルス感染症では死に至る場合もあることから，マウスに馴化した SARS-CoV-2 株を感染させたマウス致死モデルを用いて，感染から 14 日間の体重変化率，生存率及び生存期間を確認した．感染 24 時間後からエンシトレルビルフマル酸を 4，8，16 及び 32 mg/kg の用量で 12 時間ごとに bid の 5日間経口投与を実施した結果，感染 14日後における生存率は，媒体対照群では 37.5%，4 mg/kg 投与群では 91.7%，8，16 及び 32 mg/kg 投与群では 100%であり，エンシトレルビルフマル酸投与により生存期間が有意に延長し，感染に伴う体重減少が用量依存的に抑制された．以上の結果から，エンシトレルビルフマル酸はマウスにおける SARS-CoV-2 感染に伴う病態進展を抑制するものと考えられた．

2.6.2.6.1.4 臨床で有効性が期待できる血漿中濃度

SARS-CoV-2 感染 24 時間後のマウスにエンシトレルビルフマル酸を投与開始した際，用量依存的に肺内ウイルス力価の低下が認められた．PK/PD 解析から，初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価の低下量と良好に相関するエンシトレルビルフマル酸の PK パラメータは，$AUC_{0\text{-}48hr}$，C_{48hr} 及び $Time_{High}$ ($5 \times$ PA-EC_{50}，$10 \times$ PA-EC_{50}) であった．血漿中濃度の維持に関連している C_{48hr}/PA-EC_{50}，$Time_{High}$ ($5 \times$ PA-EC_{50}，$10 \times$ PA-EC_{50}) が肺内ウイルス力価の低下とよく相関していることから，SARS-CoV-2 感染から 24 時間後に投与開始したマウス感染モデルでは，

抗ウイルス活性を発揮するために必要なエンシトレルビルの血漿中濃度を，投与期間を通じて維持することが抗ウイルス活性を発揮するために重要であることが示唆された．本マウスモデルにおける PK/PD 解析結果から，初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価を 1 log_{10}，2 log_{10} 及び 3 log_{10} $TCID_{50}$/mL 低下させるために必要な C_{48hr}/PA-EC_{50} はそれぞれ，0.769，3.78 及び 14.7 であった（表 2.6.2.6-1）．VeroE6/TMPRSS2 細胞から求めたマウス PA-EC_{50} (2090 ng/mL [3.93 µmol/L])を用いて計算すると，肺内ウイルス力価を 1 log_{10}，2 log_{10} 及び 3 log_{10} $TCID_{50}$/mL 低下させるために必要な C_{48hr} は，それぞれ，1610，7900 及び 30700 ng/mL と算出された．また，VeroE6/TMPRSS2 細胞から求めたヒト PA-EC_{50} (1610 ng/mL [3.02 µmol/L])を用いて計算した場合，ヒトにおいてウイルス力価を 1 log_{10}，2 log_{10} 及び 3 log_{10} $TCID_{50}$/mL 低下させるために必要な血漿中濃度は，それぞれ，1240，6090 及び 23700 ng/mL と推定された．

申請用法用量 (375/125 mg [投与 1 日目のみ 375 mg，その後投与 2～5 日目に 125 mg 投与の 1日 1 回反復投与]) におけるヒトの C_{24hr} は 14000～17700 ng/mL (2.7.2.2.1.1 項参照) であり，マウス感染モデルにおける 2 log_{10} $TCID_{50}$/mL の肺内ウイルス力価低下と同等以上の効果が期待できる．

表 2.6.2.6-1 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいて感染 24 時間後よりエンシトレルビルフマル酸を投与したときの初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価低下と C_{48hr}/PA-EC_{50} の関係性

Virus titer reduction [a]	C_{48hr}/PA-EC_{50}
1 log_{10} $TCID_{50}$/mL	0.769
2 log_{10} $TCID_{50}$/mL	3.78
3 log_{10} $TCID_{50}$/mL	14.7

a Virus titer reduction by 1 log_{10}, 2 log_{10}, and 3 log_{10} $TCID_{50}$/mL compared to the mean virus titer of the vehicle treatment group 48 hours after the first administration of ensitrelvir fumaric acid in the mouse model

hAEC を用いた検討では SARS-CoV-2 感染 3 日後に気相側に培地を添加し，回収した培地中に含まれるウイルス量を指標としたエンシトレルビルフマル酸の EC_{90} は 0.0514～0.195 µmol/L (27.4～104 ng/mL) であり，VeroE6/TMPRSS2 細胞から求めたヒト血清の potency shift を掛け合わせた PA-EC_{90} は 0.308～1.17 µmol/L (164～624 ng/mL)，このうちデルタ株に対する EC_{90} (0.117 µmol/L) とヒト血清の Potency shift を掛け合わせた PA-EC_{90} は 0.702 µmol/L (374 ng/mL) となった．また，ヒト血清タンパク結合率 97.7%で補正した EC_{90} は，2.23～8.48 µmol/L (1190～4520 ng/mL) であった．

申請用法用量 (375/125 mg [投与 1 日目のみ 375 mg，その後投与 2～5 日目に 125 mg 投与の 1日 1 回反復投与]) におけるヒトの C_{24hr} は 14000～17700 ng/mL (2.7.2.2.1.1 項参照) であり，hAEC の PA-EC_{90} 及びヒト血清タンパク結合率で補正した EC_{90} を十分に超えていた．

2.6.2.6.1.5 エンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下

エンシトレルビルフマル酸に対する低感受性ウイルスについて情報を得るため，SARS-CoV-

2 を VeroE6/TMPRSS2 細胞に感染させ，エンシトレルビルフマル酸存在下で継代培養したところ，3CL プロテアーゼをコードする non-structural protein 5 (nsp5) の酵素活性中心近くに位置するアミノ酸に置換が認められ，D48G，M49L，P52S 及び S144A のアミノ酸置換を有するウイルスが分離された．また，S144A と M49L/S144A の混合による M49(M/L)/S144A のアミノ酸置換を有するウイルスも分離された. 一方で, nsp5 領域にアミノ酸の置換が見られたウイルスでは，11 個の nsp5 切断部位には，アミノ酸の置換は検出されなかった．リバースジェネティクス法により作出した nsp5 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を有する組換えウイルスは，耐性ウイルス分離試験で得られたそれぞれのアミノ酸置換を有する分離ウイルスと同様に，エンシトレルビルフマル酸の感受性が 4.3 倍，17 倍，3.7 倍，9.2 倍及び 100 倍低下したことから，nsp5 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換は，エンシトレルビルフマル酸の感受性低下の責任変異であると考えた. nsp5 D48G, M49L, P52S, S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を有するウイルスは，VeroE6/TMPRSS2 細胞において野生型ウイルスと同等の増殖能を示し，レムデシビル，PF-07321332，REGN-COV2 に対して交叉耐性を示さなかった．ヒト鼻腔由来細胞の MucilAir™において，D48G，M49L，及び S144A のアミノ酸置換を持つウイルスの競合増殖能は，野生型ウイルスと同等であった．一方で，P52S 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を持つウイルスは，野生型ウイルスと比較して，競合増殖能は低かった． 2022 年 5 月 27 日時点の GISAID の SARS-CoV-2 アミノ酸配列データを用いて nsp5 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を有する配列の割合を解析したところ，D48G，M49L，P52S 及び S144A の割合は極めて低く (≤0.001%)，M49L/S144A のアミノ酸置換は検出されなかった．また，2023 年 3 月 15 日時点の GISAID の SARS-CoV-2 アミノ酸配列データを用い，3CL プロテアーゼ共結晶構造においてエンシトレルビルから 5Å 以内に位置する 24 種のアミノ酸の置換割合を解析したところ, アミノ酸配列は極めて高度に保存されていた (≥99.946%).

第 2/3 相試験 (T1221 試験) Phase 2a Part において，エンシトレルビルフマル酸投薬後に認められた nsp5 領域のアミノ酸置換 L87F，T198I，A234S 及び H246Y を有する SARS-CoV-2 変異体をリバースジェネティクス法により調製し，エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性を評価した．L87F，T198I，A234S 及び H246Y のアミノ酸置換を有する変異体に対するエンシトレルビルフマル酸の EC_{50} は野生型と比較して，それぞれ 0.92 倍，1.5 倍，1.7 倍及び 0.90 倍となり，感受性の変化は認められなかった．

2.6.2.6.2 副次的薬理試験

エンシトレルビルフマル酸の各種受容体，イオンチャネル，トランスポーター及び酵素に対する作用，ヒトの初代培養細胞及び各種組織由来株化細胞に対する細胞毒性，並びに HepG2 細胞に対するミトコンドリア毒性を評価した．

各種受容体，イオンチャネル，トランスポーター及び酵素に対する作用を評価したところ，アデノシントランスポーターによるアデノシン取り込み作用に対する IC_{50} は 1.43 μmol/L であった．また，PDE4A1A，PDE4B1，PDE4C1 及び PDE4D2 の酵素活性に対する IC_{50} は，それぞれ 63.2，69.1，75.7 及び 73.4 μmol/L であった．その他の受容体，イオンチャネル，トランスポー

ター及び酵素に対して 100 µmol/L (53.2 µg/mL) の濃度まで影響はなかった.

エンシトレルビルフマル酸のアデノシントランスポーターに対する IC_{50} (1.43 µmol/L) は，申請用法用量における非結合型 C_{max} (1.2 µmol/L；総薬物濃度 [28.1 µg/mL]，分子量 [531.88] 及びヒト血漿中タンパク結合率 [97.7%] から算出) の 1.2 倍であった (2.6.4.4.1.1 項及び 2.7.2.2.1.1 項参照). アデノシントランスポーターの阻害は，血中アデノシン濃度の上昇に繋がる可能性があり，アデノシンの主な薬理作用として中枢神経系 (睡眠導入の低下)，心血管系 (血圧及び心拍数の減少)，血小板凝集の阻害及び免疫系 (抗炎症効果) への影響が報告されている [4]. しかしながら，安全性薬理試験並びにラット及びサルを用いた反復毒性試験 (2.6.6.3 項参照) においてエンシトレルビルフマル酸によるアデノシントランスポーターの阻害に起因すると考えられる影響は認められなかった. また，本剤の第 1 相及び第 2/3 相試験 (T1221 試験) において上述した事象に関連する有害事象は認められていない (2.5.5.2 項参照).

他にエンシトレルビルフマル酸による 4 種のサブタイプの PDE4 阻害活性が認められたが，その IC_{50} 値 (63.2～75.7 µmol/L) は，申請用法用量における非結合型 C_{max} (1.2 µmol/L) に対して 53～63 倍乖離しており，申請用法用量において非選択的 PDE4 阻害による懸念は低いと判断した.

異なるヒト組織に由来する 9 種の株化細胞及び 3 種のヒト初代培養細胞に対する CC_{50} は，いずれの細胞においても 72 µg/mL (135 µmol/L) 超える濃度と推定された. また HepG2 細胞に対するミトコンドリア毒性は 300 µg/mL (564 µmol/L) まで認められなかった. エンシトレルビルフマル酸の各 SARS-CoV-2 株に対する EC_{50} (0.026～0.99 µmol/L) との間に約 140 倍以上の十分な乖離がみられたことから，エンシトレルビルフマル酸のヒト由来細胞及びミトコンドリアへの障害性に対する懸念は低いと判断した.

以上のことから，申請用法用量においてエンシトレルビルフマル酸投与に起因した副次的薬理作用による副作用発現の懸念は低いと判断した.

2.6.2.6.3　　安全性薬理試験

安全性薬理コアバッテリー試験として，エンシトレルビルフマル酸の中枢神経系，心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した. 安全性薬理コアバッテリー試験の概要及び血漿中曝露量と臨床用量における血漿中曝露量との比を表 2.6.2.6-2 に示す.

表 2.6.2.6-2　　安全性薬理コアバッテリー試験結果及び血漿中曝露量と臨床用量における血漿中曝露量との比

試験種	投与量/適用濃度	特筆すべき所見	無影響量における血漿中曝露 (C_{max}) (ヒト曝露比)
ラット中枢神経系	0 (対照群)，20，100，1000 mg/kg	中枢神経系への影響なし (無影響量 1000 mg/kg)	294 µg/mL (10.5)[a]
hERG アッセイ	0 (対照群)，10，30，100 µmol/L (それぞれ 0，5.32，16.0，53.2 µg/mL)	IC_{50} ＞100 µmol/L (53.2 µg/mL)	−

サル心血管系	0 (対照群), 10, 50, 150 mg/kg	軽度な心拍数の増加 (≥ 50 mg/kg) (無影響量 10 mg/kg)	43.8 µg/mL (1.6)[b]
サル呼吸系	0 (対照群), 50, 150 mg/kg	なし (無影響量 150 mg/kg)	326 µg/mL (11.6)[b]

a ラット 2 週間反復経口投与毒性試験の 1000 mg/kg/日投与群の雄における投与 1 日目の C_{max} 値と健康成人対象第 1 相試験 (T1211 試験) の 375/125 mg (投与 1 日目のみ 375 mg，その後投与 2～5 日目に 125 mg 投与の 1 日 1回反復投与) 投与 5 日目の C_{max} (28.1 µg/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) との比
b 各無影響量における C_{max} と第 1 相試験 (T1211 試験) の 375/125 mg 投与 5 日目の C_{max} (28.1 µg/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) との比

ラット中枢神経系への作用を評価する試験では，1000 mg/kg 投与群まで中枢神経系への影響を示唆する変化はなく，無影響量は 1000 mg/kg と判断した．ラットへの単回経口投与時の中枢神経系に対する無影響量における C_{max} と申請用法用量の C_{max} (28.1 µg/mL) との比は 10.5 倍であった (表 2.6.2.6-2).

hERG 導入細胞におけるカリウム電流に対する作用試験において, hERG 電流に対する IC_{50} は 100 µmol/L (53.2 µg/mL) を超える濃度と推定された．また，サル心血管系及び呼吸系への作用を評価する試験では, 50 及び 150 mg/kg の用量で軽度な心拍数の増加が認められたが, 150 mg/kg の用量まで血圧，心電図，呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった．サルへの単回経口投与時の心血管系に対する無影響量 (10 mg/kg) 及び呼吸系に対する無影響量 (150 mg/kg) における C_{max} と，申請用法用量の C_{max} との比はそれぞれ 1.6 又は 11.6 倍であった (表 2.6.2.6-2). なお，本剤の第 1 相 (T1211 試験) 及び第 2/3 相試験 (T1221 試験) においてエンシトレルビルフマル酸投与に起因した中枢神経系，心血管系及び呼吸系への影響を示唆する有害事象は認められていない (2.5.5.2 項参照).

以上の安全性薬理試験の結果から，本剤の申請用法用量において，中枢神経系，心血管系及び呼吸系に関して，重篤な有害事象が生じる可能性は低いと考えられる．

2.6.2.7 図表

図表は本文中の適切な場所に記載した．

2.6.2.8 参考文献

1. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 1984;22:27-55
2. Sanuki Y, Araki T, Nakazono O, Tsurui K. A rapid mitochondrial toxicity assay utilizing rapidly changing cell energy metabolism. J Toxicol Sci 2017;42(3):349-58.
3. Boras B, Jones RM, Anson BJ, et al. Preclinical characterization of an intravenous coronavirus 3CL protease inhibitor for the potential treatment of COVID19. Nature Communications 2021;12:6055:https://doi.org/10.1038/s41467-021-26239-2.
4. Borea PA, Stefania G, Stefania M, Fabrizio V, Katia V. Pharmacology of adenosine receptors. The state of the art. Physiol Rev 2018;98(3):1591-625.