ゾコーバ錠 125mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.4 非臨床試験の概括評価

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 3
2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.1.1 In vitro 活性 5
2.4.2.1.2 In vivo 活性 11
2.4.2.1.3 エンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下アミノ酸変異に関する検討 11
2.4.2.2 副次的薬理試験 12
2.4.2.3 安全性薬理試験 12
2.4.3 薬物動態試験 12
2.4.4 毒性試験 12
2.4.4.1 単回投与毒性試験 12
2.4.4.2 反復投与毒性試験 12
2.4.4.3 遺伝毒性試験 13
2.4.4.4 がん原性試験 13
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 13
2.4.4.6 局所刺激性試験 13
2.4.4.7 その他の毒性試験 13
2.4.4.7.1 HDL コレステロール減少機序解明のための試験 13
2.4.5 総括及び結論 14
2.4.6 参考文献 14

表

表 2.4.2-1 エンシトレルビルフマル酸の抗ウイルス活性を評価した SARS-CoV-2 臨床分離株 6
表 2.4.2-2 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 7
表 2.4.2-3 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 8
表 2.4.2-4 リバースジェネティクス法により調製した SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ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，ニルマトレルビルの抗ウイルス活性の Fold change 10

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
3CL	3C-like	(3C 様)
COVID-19	coronavirus disease 2019	新型コロナウイルス感染症
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
E166A	glutamic acid-to-alanine at amino acid position 166	N 末端側から 166 番目のグルタミン酸がアラニンに置換
E166V	glutamic acid-to-valine at amino acid position 166	N 末端側から 166 番目のグルタミン酸がバリンに置換
$EC_{50\ (90)}$	50% (90%) effective concentration	50% (90%) 有効濃度
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)
hAEC	human airway epithelial cells	ヒトプライマリー気道上皮細胞
HDL	high density lipoprotein	高比重リポタンパク質
L50F	leucine-to-phenylalanine at amino acid position 50	N 末端側から 50 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換
L167F	leucine-to-phenylalanine at amino acid position 167	N 末端側から 167 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換
LCAT	lecithin:cholesterol acyltransferase	レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ
M49I	methionine-to-isoleucine at amino acid position 49	N 末端側から 49 番目のメチオニンがイソロイシンに置換
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
nsp5	non-structural protein 5	非構造タンパク質 5
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
PHEIC	Public Health Emergency of International Concern	国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態
S144A	serine-to-alanine at amino acid position 144	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
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

略号	英語	日本語
T25A	threonine-to-alanine at amino acid position 25	N 末端側から 25 番目のトレオニンがアラニンに置換
T25N	threonine-to-asparagine at amino acid position 25	N 末端側から 25 番目のトレオニンがアスパラギンに置換
WHO	World Health Organization	世界保健機関

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) と命名され，世界保健機関 (WHO) は 2020 年 1 月 30 日に「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態 (PHEIC)」を宣言した．その後，世界的な感染拡大の状況や重症度等から，2020 年 3 月 11 日に COVID-19 はパンデミック (世界的な大流行) の状態であると表明されたが，変異株の主流がオミクロン株となったことによる臨床症状の軽症化やワクチンの普及により，重症化率や死亡率は低下してきた状況を受け，WHO は 2023 年 5 月 6 日に PHEIC の宣言を終了した [1]．本邦でも，2023 年 5 月 8 日に SARS-CoV-2 感染症は 2 類感染症からインフルエンザ感染症と同じ 5 類感染症の扱いとなった．しかし，SARS-CoV-2 は変異を繰り返しながら流行を繰り返しており，最近では 2024 年 6 月～9 月にかけて第 11 波が観測された [2]．今後も流行状況は不透明である．

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) は，塩野義製薬株式会社によって創製された COVID-19 の治療薬及び予防薬として開発されている．SARS-CoV-2 遺伝子にコードされる複合タンパク質のプロセシング及びウイルス複製に必須である 3C-like (3CL) プロテアーゼ (別名メインプロテアーゼ又は非構造タンパク質 5 [nsp5]) を阻害することにより SARS-CoV-2 の増殖を阻害する．

エンシトレルビルフマル酸の非臨床評価は通常申請時に実施しており，その試験成績は通常申請時に提出した資料に基づき審査されている (1.13 項 既承認医薬品に係る資料 [通常申請])．本申請では新たに，薬理試験として効力を裏付ける試験，安全性試験として，特定された副作用 (1.13 項 既承認医薬品に係る資料 [通常申請]) である，高比重リポタンパク質 (HDL) コレステロール減少機序解明のための試験を追加実施した．

薬理試験及び安全性試験は信頼性基準を適用して実施した．

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 In vitro 活性

SARS-CoV-2 易感染性の細胞株である VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いた in vitro 試験において，エンシトレルビルフマル酸の SARS-CoV-2 による細胞変性抑制効果を検討した．臨床分離 SARS-CoV-2 株として，スパイクタンパクに変異を有する複数のオミクロン株 (Pango lineage BA.2.86，EG.5.1，JN.1，KP.3.1.1，XEC) を用いた．これまでの VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いた評価から，エンシトレルビルフマル酸は，従来株及び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，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) に対して，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 (臨床分離株に対する EC_{50} は 0.22～0.99 μmol/L) が示されている．今回検討したオミクロン株に対する EC_{50} は，0.196～0.612 μmol/L であったことから，抗ウイルス活性の感受性の違いは株間で小さいことが明らかとなった (2.6.2.2.1.1 項参照)．これまで抗ウイルス活性を評価した臨床分離株一覧とその 3CL プロテアーゼ及びプロテアーゼ切断部位上の

アミノ酸変異を表 2.4.2-1 に，これまで VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて評価した臨床分離株に対するエンシトレルビルフマル酸の抗ウイルス活性を表 2.4.2-2 に示す.

表 2.4.2-1　　エンシトレルビルフマル酸の抗ウイルス活性を評価した SARS-CoV-2 臨床分離株

Strains	WHO Label	Pango Lineage	Mutations	
			3CL Protease	3CL Protease cleavage site
hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020	(Ancestral)	A	–	–
hCoV-19/Japan/QK002/2020	Alpha	B.1.1.7	–	–
hCoV-19/Japan/QHN001/2020	Alpha	B.1.1.7	–	–
hCoV-19/Japan/QHN002/2020	Alpha	B.1.1.7	–	–
hCoV-19/Japan/TY8-612/2021	Beta	B.1.351	K90R	–
hCoV-19/Japan/TY7-501/2021	Gamma	P.1	–	–
hCoV-19/Japan/TY7-503/2021	Gamma	P.1	–	–
hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021	Delta	B.1.617.2	G15S	–
hCoV-19/Japan/TY28-444/2021	Theta	P.3	–	–
hCoV-19/Japan/TY33-456/2021	Lambda	C.37	–	–
hCoV-19/Japan/TY26-717/2021	Mu	B.1.621	–	–
hCoV-19/Japan/TY38-873/2021	Omicron	BA.1.18	P132Y	–
hCoV-19/Japan/TY38-871/2021	Omicron	BA.1.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY40-385/2022	Omicron	BA.2	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-721/2022	Omicron	BA.2.12.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-716/2022	Omicron	BA.2.75	P132H	–
hCoV-19/USA/MI-UM-10052670540/2023	Omicron	BA.2.86	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-703/2022	Omicron	BA.4.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-763/2022	Omicron	BA.4.6	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-704/2022	Omicron	BA.5.2.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-702/2022	Omicron	BE.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-820/2022	Omicron	BF.7	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-828/2022	Omicron	BF.7.4.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-796/2022	Omicron	BQ.1.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-832/2022	Omicron	CH.1.1.11	P132H	–
hCoV-19/Japan/RB23-006-81/2023	Omicron	EG.5.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/RB24-001-48/2024	Omicron	JN.1	P132H	–
hCoV-19/France/BRE-RELAB-IPP06405/2024	Omicron	KP.3.1.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-795/2022	Omicron	XBB.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/23-018/2022	Omicron	XBB.1.5.19	P132H	nsp7 K2R
hCoV-19/Japan/TY41-951/2023	Omicron	XBB.1.9.1	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-984/2023	Omicron	XBB.1.16	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-831/2022	Omicron	XBF	P132H	–
hCoV-19/Japan/TY41-686/2022	Omicron	XE	P132H	–
hCoV-19/France/IDF-RELAB-IPP09137/2024	Omicron	XEC	P132H	–
SARS-CoV-2 MA-P10[a]	(Mouse adapted strain)	-	E270G	–

P132Y: proline-to-tyrosine at amino acid position 132, K2R: lysine-to-arginine at amino acid position 2, K90R: lysine to arginine at amino acid position 90

[a] mouse adapted strain originating from the ancestral strain (SARS-CoV-2 MA-P10 [mouse-adapted

hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 strain])

表 2.4.2-2 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	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/USA/MI-UM-10052670540/2023	BA.2.86	0.261	0.021	0.877	0.022
hCoV-19/Japan/TY41-703/2022	BA.4.1	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)	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/RB23-006-81/2023	EG.5.1	0.612	0.066	1.59	0.27
hCoV-19/Japan/RB24-001-48/2024	JN.1	0.196	0.101	0.879	0.085
hCoV-19/France/BRE-RELAB-IPP06405/2024	KP.3.1.1	0.387	0.206	1.090	0.200
hCoV-19/Japan/TY41-795/2022	XBB.1	0.33	0.098	0.95	0.075
hCoV-19/Japan/23-018/2022	XBB.1.5.19 [a]	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
hCoV-19/France/IDF-RELAB-IPP09137/2024	XEC	0.309	0.091	0.946	0.121
SARS-CoV-2 MA-P10	-	0.12	0.040	1.6	0.11

The mean and SD were calculated from 3 independent experiments.
a Described as XBB.1.5 (Report S-217622-EB-196-N)
BA.2.86，EG.5.1，JN.1 以外の臨床分離株に関する結果は 1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (通常申請] に記載
BA.2.86，EG.5.1，JN.1 に関する結果は 2.6.2.2.1.1 項参照

ヒト鼻腔上皮由来細胞の MucilAir™に SARS-CoV-2 臨床分離株 (オミクロン株 [Pango lineage XBB.1.5.19]) を感染させたときのエンシトレルビルフマル酸の EC_{90} は，0.0784 µmol/L であった．エンシトレルビルフマル酸は，ヒトプライマリー気道上皮細胞 (hAEC) において，オミクロン株に対し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 (2.6.2.2.1.1 項参照)．これまで hAEC を用いて評価した臨床分離株に対するエンシトレルビルフマル酸の抗ウイルス活性の結果を表 2.4.2-3 に示す．

表 2.4.2-3　　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	Days post infection	Ensitrelvir fumaric acid EC_{90} (µmol/L)	
				Mean	SD
Nasal epithelial cells	hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021	B.1.617.2	2	0.0514	0.0182
			3	0.117	0.026
Nasal epithelial cells	hCoV-19/Japan/TY38-873/2021	BA.1.18	1	0.0660	0.0125
			2	0.160	0.0556
Nasal epithelial cells	hCoV-19/Japan/TY41-702/2022	BE.1 (BA.5-like)	2	0.0601	0.0328
Nasal epithelial cells	hCoV-19/Japan/23-018/2022	XBB.1.5.19	3	0.0784	0.0362
Bronchial epithelial cells	hCoV-19/Japan/TY38-873/2021	BA.1.18	3	0.154	0.0518
			4	0.195	0.0196

The mean and SD were calculated from 3 independent experiments.
XBB.1.5.19 以外の臨床分離株に関する結果は 1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (通常申請) に記載
XBB.1.5.19 に関する結果は 2.6.2.2.1.1 項参照

ニルマトレルビル耐性に関連する 3CL プロテアーゼのアミノ酸置換を有する 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．ニルマトレルビル感受性低下責任変異 (N 末端側から 166 番目のグルタミン酸がバリンに置換 [E166V]) を伴う，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) + E166V，N 末端側から 50 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換 (L50F) + E166V に対し，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，2.76 倍，2.81 倍となり，明らかな感受性の低下は認められず，エンシトレルビルフマル酸はニルマトレルビル感受性低下責任変異に対して交叉耐性を示さなかった．エンシトレルビルフマル酸感受性低下責任変異である，144番目のセリンがアラニンに置換 (S144A) を伴う T21I + S144A は，S144A と同様に，エンシトレルビルフマル酸に対する感受性が低下していると判断した．野生型と比較してエンシトレルビルフマル酸の感受性が EC_{50} で 3 倍以上低下したアミノ酸置換として，N 末端側から 167 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換 (L167F)，L50F + N 末端側から 166 番目のグルタミン酸がアラニンに置換 (E166A)，L50F + E166A + L167F が認められた．これらのアミノ酸置換では，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，3.57 倍，6.16 倍，59.5 倍となった．その他の変異では，EC_{50} の変化は野生型と比較して 3 倍未満となり，エンシトレルビルフマル酸感受性の明らかな低下は認められなかった (2.6.2.2.1.2 項及び 2.6.2.2.1.3 項参照)．

これまで評価した，hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 由来のリバースジェネティクス法調製 SARS-CoV-2 変異体に対するエンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性評価結果を表 2.4.2-4 に示す.

表 2.4.2-4 リバースジェネティクス法により調製した SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ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，ニルマトレルビルの抗ウイルス活性の Fold change

Virus[a,b] (rgSARS-CoV-2/Hu/DP /Kng/19-020)	Fold change[c]			Description	Evaluated study
	Ensitrelvir fumaric acid	Remdesivir	Nirmatrelvir		
T21I	1.11	1.14	1.82	NTV	d
T25A	14.4	1.31	1.06	ETV	d
T25I	2.86	0.741	0.626	ETV	d
T25N	4.84	0.275	0.213	ETV	e
D48G [f]	4.3	1.0	1.0	IVR	g
D48Y	2.22	0.970	1.20	ETV	d
M49I	5.25	0.731	0.248	ETV	d
M49L [f]	17	0.52	0.68	IVR, ETV	h
L50F	1.18	0.572	1.34	NTV	d
P52S [f]	3.7	1.0	0.54	IVR	g
L87F	0.92	0.47	NT	ETV	i
F140L	< 0.530	0.148	0.287	NTV	e
S144A [f]	9.2	0.90	1.4	IVR, ETV	h
E166A	3.39	0.776	1.21	NTV, ETV	d
L167F	3.57	1.13	1.32	NTV	e
H172Y	0.781	0.415	0.576	NTV	d
A173V*	0.390	0.960	1.24	NTV	e
T198I	1.5	0.72	NT	ETV	i
A234S	1.7	1.2	NT	ETV	i
H246Y	0.90	0.93	NT	ETV	i
P252L	1.08	0.910	1.15	NTV	d
T304I	0.849	1.08	1.06	NTV	e
T21I + 166V	2.76	0.876	36.0	NTV	d
T21I + S144A	7.29	1.17	2.98	NTV	e
T21I + A173V	0.468	0.955	1.32	NTV	e
T21I + T304I	1.33	1.22	2.11	NTV	e
M49L + S144A [f]	100	0.53	1.3	IVR	h
L50F + E166A	6.16	1.01	3.17	NTV	e
L50F + E166V	2.81	0.672	43.4	NTV	d
F140L + A173V	0.436	0.226	1.09	NTV	e
A173V + T304I	< 0.174	0.268	0.424	NTV	e
T21I + A173V + T304I	< 0.322	1.15	1.46	NTV	e
L50F + E166A + L167F	59.5	0.667	9.78	NTV	e

ETV = ensitrelvir treatment emergent amino acid substitution detected in the clinical studies, IVR = amino acid substitution detected in in vitro resistance studies of ensitrelvir, NTV = nirmatrelvir resistance related amino acid substitution

a. All viruses are in the background of hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020. Recombinant virus was named as rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020. Denoted mutations are in 3CL protease.

b. Amino acid substitutions are abbreviated as following. A173V = alanine-to-valine at amino acid position 173; A234S = alanine-to-serine at amino acid position 234, D48G = aspartic acid-to-glycine at amino acid position 48, D48Y = aspartic acid-to-tyrosine at amino acid position 48, E166A = glutamic acid-to-alanine at amino acid position 166, E166V = glutamic acid-to-valine at amino acid position 166, F140L = phenylalanine-to-leucine at amino acid position 140, H172Y = histidine-to-tyrosine at amino acid position 172, H246Y = histidine-to-tyrosine at amino acid position 246, L50F = leucine-to-phenylalanine at amino acid position 50, L87F = leucine-to-phenylalanine at amino acid

position 87, L167F = leucine-to-phenylalanine at amino acid position 167, M49I = methionine-to-isoleucine at amino acid position 49, M49L = methionine-to-leucine at amino acid position 49, P52S = proline-to-serine at amino acid position 52, P252L = proline-to-leucine at amino acid position 252, S144A = serine-to-alanine at amino acid position 144, T21I = threonine-to-isoleucine at amino acid position 21, T25A = threonine-to-alanine at amino acid position 25, T25I = threonine-to-isoleucine at amino acid position 25, T25N = threonine-to-asparagine at amino acid position 25, T198I = threonine-to-isoleucine at amino acid position 198, T304I = threonine-to-isoleucine at amino acid position 304.

c. Fold change was calculated as relative EC_{50} to wild-type.
d. Study S-217622-EB-214-N [4.2.1.1-05]
e. Study S-217622-EB-221-N [4.2.1.1-06]
f. Virus including reporter gene
g. Study S-217622-EB-116-N (1.13 項 既承認医薬品に係る資料 [通常申請]に記載)
h. Study S-217622-EB-103-N (1.13 項 既承認医薬品に係る資料 [通常申請]に記載)
i. Study S-217622-EB-178-N (1.13 項 既承認医薬品に係る資料 [通常申請]に記載)
* Sanger sequencing analysis (Study S-217622-EB-223-X [4.2.1.1-11]) revealed that T21T/I was introduced into the nsp5 sequence of the A173V virus.

2.4.2.1.2 In vivo 活性

In vivo 評価では，SARS-CoV-2 マウス馴化株 (SARS-CoV-2 MA-P10) を接種させた，致死的感染モデルに対するエンシトレルビルの予防的効果を評価した．媒体対照群では，感染 8 日後までにすべてのマウスが死亡した．エンシトレルビルを，32，64，96 及び 128 mg/kg の用量でマウスに感染 24 時間前に皮下投与した場合，感染 14 日後の生存率は，それぞれ，6.7%，60%，80%及び 100%となり，用量の増加に伴って生存率が改善し，生存期間が延長した．さらに，エンシトレルビルを，32，64，96 及び 128 mg/kg の用量でマウスに投与した場合，感染 3～7 日目で，媒体対照群と比較して，ウイルス感染による体重減少を有意に抑制した．また，エンシトレルビルの 64 mg/kg 投与群の肺内ウイルス力価は，感染 1 日後に，媒体対照群と比較して有意に低下し，エンシトレルビルの 128 mg/kg 投与群の肺内ウイルス力価は，感染 1，2 及び 4 日後に，媒体対照群と比較して有意に低下した．また，雌性 BALB/c マウスにエンシトレルビルを単回皮下投与後の血漿中濃度推移から，エンシトレルビルの 64 mg/kg の用量で皮下投与 24 時間後の血漿濃度は 2990 ng/mL であった (2.6.2.2.2 項参照).

以上の結果から，エンシトレルビルは，マウスにおいて，予防的投与により，SARS-CoV-2 感染に伴う病態進展を抑制し，SARS-CoV-2 感染時点で有意な予防効果を発揮するために必要なエンシトレルビルの最小血漿中濃度は 2990 ng/mL であると考えられた．

2.4.2.1.3 エンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下アミノ酸変異に関する検討

第 2/3 相試験 (T1221 試験) 及び第 3 相試験 (T1331 試験) 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 3CL プロテアーゼのアミノ酸変異を有する 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 活性を評価したところ，以下のアミノ酸変異有する SARS-CoV-2 変異体に対し，3 倍以上感受性が低下した (2.6.2.2.1.2 項及び 2.6.2.2.1.3 項参照).

- N 末端側から 25 番目のトレオニンがアラニンに置換 (T25A)
- 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)
- N 末端側から 49 番目のメチオニンがイソロイシンに置換 (M49I)
- N 末端側から 49 番目のメチオニンがロイシンに置換 (M49L)
- N 末端側から 52 番目のプロリンがセリンに置換 (P52S)

- N 末端側から 25 番目のトレオニンがアスパラギンに置換 (T25N)
- S144A
- E166A

SARS-CoV-2 臨床分離株を用いた in vitro 検討では，SARS-CoV-2 の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アミノ酸置換として，3CL プロテアーゼの酵素活性中心近くに位置するアミノ酸の置換として，以下が認められている．

- D48G
- M49L
- P52S
- S144A
- M49L+S144A

2024 年 12 月 31 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，3CL プロテアーゼの，N 末端側から，それぞれ，48，49，52，及び 144 番目のアミノ酸である，D48，M49，P52，及び S144 の置換割合を月ごとで解析した．また，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 以内に位置するアミノ酸の置換割合を，月ごとで解析した，その結果，日本においてのみ M49L が 2023 年 10 月及び 11 月で 1%を超えたものの，2023 年 12 月以降では 1%未満に減少し，その後変異割合の上昇は認められていない．また，その他のアミノ酸では 1%を超える変異は認められていない (2.6.2.2.1.4 項参照).

2.4.2.2 副次的薬理試験

本申請に際して新たな試験は実施していない．

2.4.2.3 安全性薬理試験

本申請に際して新たな試験は実施していない．

2.4.3 薬物動態試験

本申請に際して新たな試験は実施していない．

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

本申請に際して新たな試験は実施していない．

2.4.4.2 反復投与毒性試験

本申請に際して新たな試験は実施していない．

2.4.4.3 遺伝毒性試験

本申請に際して新たな試験は実施していない.

2.4.4.4 がん原性試験

本申請に際して新たな試験は実施していない.

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

本申請に際して新たな試験は実施していない.

2.4.4.6 局所刺激性試験

本申請に際して新たな試験は実施していない.

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 HDL コレステロール減少機序解明のための試験

本申請では，その他の毒性試験として，特定された副作用 (1.13 項 既承認医薬品に係る資料[通常申請]) である，HDL コレステロールの減少の機序を検討した.

リポタンパク質の一つである HDL は，コレステロールを末梢細胞から，肝臓に逆輸送する機能を有する．Apo-A1 を含む新生 HDL 粒子は血中で産生され，新生 HDL は末梢組織細胞から輸送タンパクを介して，遊離のコレステロールを回収し，HDL2/3 コレステロールを形成する．この経路はコレステロール回収と呼ばれる. HDL2/3 により回収された遊離コレステロールはレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) によりエステル化され，コレステロールエステルは HDL2/3 粒子の中心に取り込まれ，粒子サイズが大きくなる (成熟化). HDL 中のコレステロールの主な排泄経路は，肝臓に取り込まれた後の胆汁排泄，糞便への直接排泄，及び低比重/超低比重リポタンパク質への供給である．HDL コレステロールの低下機構として，新生 HDL 産生の低下，末梢組織からのコレステロール流出の減少，LCAT によるコレステロールのエステル化の減少，コレステロールクリアランスの増加が考えられる [3-8].

HDL コレステロール減少機序解明のため，(1) コレステロールの影響を受けた画分を特定することを目的とした，第 1 相試験反復投与パートの血漿サンプルを使用した経時的脂質解析，(2) ヒト血清によるコレステロール流出への影響，(3) 血漿中の LCAT 活性への影響，及び (4) サルにおけるコレステロール排泄に及ぼす影響を評価した.

検討の結果，臨床試験でのエンシトレルビルフマル酸投与によるコレステロールの減少は，主に HDL2/3 画分の減少によるものであることが明らかとなった．また，ヒトでの詳細な HDL コレステロールの減少機序は不明であるが, エンシトレルビルフマル酸投与による HDL コレステロール画分の減少が認められているサルでは，エンシトレルビルフマル酸が LCAT 活性阻害を介して，HDL の成熟化過程に影響し，HDL コレステロールを減少させると考えられた (2.6.6.8.1 項参照).

2.4.5　総括及び結論

本剤の薬理学的及び毒性学的プロファイルを明らかにするために適切な用量を設定して非臨床試験を実施した.

エンシトレルビルフマル酸は, スパイクタンパクに変異を有する複数の臨床分離 SARS-CoV-2 株に対して，細胞障害を起こす濃度より極めて低い濃度で抗 SARS-CoV-2 活性を有し，抗ウイルス活性の感受性の違いは株間で小さいことが明らかとなった．ニルマトレルビル耐性に関連するアミノ酸置換を有する SARS-CoV-2 変異体に対して，エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性を評価した. エンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下責任変異である，S144A を伴う T21I + S144A ではエンシトレルビルフマル酸に対する感受性は低下していたものの，E166V を含むニルマトレルビル耐性変異に関しては，野生型と比較して，エンシトレルビルフマル酸の感受性の低下は認められなかった．第 2/3 相試験 (T1221 試験) 及び第 3 相試験 (T1331 試験) 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アミノ酸変異である T25A，T25N，M49I，M49L，M144A 及び E166A を有する SARS-CoV-2 変異体に対し，エンシトレルビルフマル酸の感受性は 3 倍以上低下した.

SARS-CoV-2 マウス致死性感染モデルにおいて，エンシトレルビルの予防的投与により，SARS-CoV-2 感染後の病態進展抑制効果及び SARS-CoV-2 肺内ウイルスの増殖抑制効果が確認された.

臨床試験で確認された, エンシトレルビルフマル酸投与による HDL コレステロール減少の詳細な機序は不明であるが, 同様にエンシトレルビルフマル酸投与による HDL コレステロールの減少が認められているサルでは，エンシトレルビルフマル酸が LCAT 活性阻害を介して，HDL の成熟化過程に影響し，コレステロール画分を減少させると考えられた.

エンシトレルビルフマル酸におけるヒトで注意すべき安全性は評価できており，非臨床評価として充足していると考える.

2.4.6　参考文献

1. World Health Organization. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic ＜アクセス日：2025 年 1 月 30 日＞
2. 厚生労働省．新型コロナウイルス感染症に関する報道発表資料 (発生状況) 2024 年. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000121431_00461.html ＜アクセス日：2025 年 1 月 30 日＞
3. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and reverse cholesterol transport. Circ Res 2019;124:1505-18.
4. Glomset JA. The Plasma Lecithin:cholesterol Acyltransferase Reaction. J Lipid Res 1968;9(2):155-67.
5. Remaley AT, Amar M, Sviridov D. HDL-replacement therapy: Mechanism of action, types of agents and potential clinical indications. Expert Rev Cardiovasc Ther 2008;6(9):1203-15.
6. Rousset X, Vaisman B, Amar M, Sethi AA, Remaley AT. Lecithin:cholesterol acyltransferase: from

biochemistry to role in cardiovascular disease. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2009;16(2):163-71.
7. Yamamoto S, Narita I, Kotani K. The Macrophage and its related cholesterol efflux as a HDL function index in atherosclerosis. Clin Chim Acta 2016;457:117-22
8. Márquez AB, Nazir S, van der Vorst EPC. High-Density Lipoprotein Modifications: A Pathological Consequence or Cause of Disease Progression? Biomedicines. 2020; 8(12):549.