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 4
2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.2.2.1 In vitro 試験 8
2.6.2.2.1.1 SARS-CoV-2 感染細胞における抗ウイルス活性 8
2.6.2.2.1.2 リバースジェネティクス由来 SARS-CoV-2 変異体に対する薬剤感受性試験 9
2.6.2.2.1.3 [redacted]におけるリバースジェネティクス由来 SARS-CoV-2 変異体に対する薬剤感受性試験 11
2.6.2.2.1.4 SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼの遺伝子多型解析 12
2.6.2.2.2 In vivo 試験 12
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予防投与による治療効果 12
2.6.2.2.2.2 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおけるエンシトレルビル予防投与による肺内ウイルス力価への影響 15
2.6.2.3 副次的薬理試験 16
2.6.2.4 安全性薬理試験 16
2.6.2.5 考察及び結論 16
2.6.2.5.1 効力を裏付ける試験 16
2.6.2.5.1.1 In vitro 活性 16
2.6.2.5.1.2 In vivo 活性 17
2.6.2.5.1.3 エンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下 17
2.6.2.6 図表 18
2.6.2.7 参考文献 18

表

表 2.6.2.2-1 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 8
表 2.6.2.2-2 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 9
表 2.6.2.2-3 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 (1) 10
表 2.6.2.2-4 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，ニルマトレルビル

の抗ウイルス活性の Fold change (2)..... 11
表 2.6.2.2-5 SARS-CoV-2 感染モデルマウスにおけるエンシトレルビルの単回皮下投与後の血漿中エンシトレルビルの血漿中濃度..... 14
表 2.6.2.2-6 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいてエンシトレルビルを感染 24 時間前に単回皮下投与したときの肺内ウイルス力価への影響..... 15

図

図 2.6.2.2-1 エンシトレルビルを感染 24 時間前に単回皮下投与したときの 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..... 13
図 2.6.2.2-2 エンシトレルビルを感染 24 時間前に単回皮下投与したときの SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおける感染後の体重変化率..... 14

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
3CL	3C-like	(3C 様)
C_{24hr}	plasma concentration at 24 hours post-dose	投与 24 時間後の血漿中濃度
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
D48Y	aspartic acid-to-tyrosine at amino acid position 48	N 末端側から 48 番目のアスパラギン酸がチロシンに置換
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
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
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
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)
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
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
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
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
T25I	threonine-to-isoleucine at amino acid position 25	N 末端側から 25 番目のトレオニンがイソロイシンに置換

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
$TCID_{50}$	50% tissue culture infectious dose	50%組織細胞感染価
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．エンシトレルビルフマル酸の薬理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，効力を裏付ける試験を追加実施した．

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 (別名メインプロテアーゼ又は非構造タンパク質 5 [nsp5]) 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，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を皮下投与した後，SARS-CoV-2 をマウスに感染させ，エンシトレルビル投与による，肺内でのウイルス力価増殖抑制効果，体重減少抑制効果及び生存率改善効果を評価した．

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 細胞を用いて，SARS-CoV-2 臨床分離オミクロン株 (Pango lineage BA.2.86，EG.5.1，JN.1，KP.3.1.1，XEC) 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，0.196～0.612 µmol/L であった．

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，ヒト鼻腔上皮由来細胞由来のヒト気道上皮 in vitro 3D モデルである MucilAir™ に SARS-CoV-2 オミクロン株 (Pango lineage XBB.1.5.19) 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_{90} は 0.0784 µmol/L であり，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．50 µmol/L のエンシトレルビルフマル酸を処置した細胞生存率はほとんど低下しなかったことから，エンシトレルビルフマル酸は，hAEC において，臨床分離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．

第 2/3 相試験 (T1221 試験) 及び第 3 相試験 (T1331 試験) で，エンシトレルビルフマル酸投薬後，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に認められた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．その結果，3CL プロテアーゼの 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 25 番目のトレオニンがアスパラギンに置換 (T25N)，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)，及び 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) したアミノ酸置換を有する変異体に

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 3 倍以上低下した．

3CL プロテアーゼ阻害剤であるニルマトレルビルに対する感受性低下の責任変異である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．その結果，3CL プロテアーゼの 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．また，T21I 及びエンシトレルビル感受性低下の責任変異である 144番目のセリンがアラニンに置換 (S144A) を有する T21I + S144A では，感受性が低下する傾向があった．また，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 + E166A，L50F + E166A + L167F が認められた．一方で，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．

これまで，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単数置換 (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]，S144A，及び複数置換 (M49L + S144A) が認められている．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．

マウスを用い，エンシトレルビルの予防的投与による SARS-CoV-2 感染後の病態進展抑制効果及びウイルス増殖抑制効果について検証した．マウスにエンシトレルビルを予防的に単回皮下投与し，投与 24 時間後に SARS-CoV-2 マウス馴化株を感染させた結果，エンシトレルビル 64，96 及び 128 mg/kg 投与群では，媒体対照群に比べて有意な致死抑制効果が確認され，体重減少も有意に抑制された．また，エンシトレルビルの 64 及び 128 mg/kg 投与群で感染 1，2，4 及び 9 日後のマウス肺内ウイルス力価を評価したところ，媒体対照群に比べてウイルス力価の増加が有意に抑制された．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．

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．

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.

2.6.2.2 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 感染細胞における抗ウイルス活性

評価資料 4.2.1.1-01，4.2.1.1-02，4.2.1.1-12

参考資料 4.2.1.1-03

概要表 2.6.3.2.1，2.6.3.2.2，2.6.3.2.3，2.6.3.2.12

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．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．SARS-CoV-2 臨床分離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，0.196～0.612 µmol/L であった (表 2.6.2.2-1).

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 オミクロン株 (Pango lineage XBB.1.5.19) を感染させ, エンシトレルビルフマル酸とともに 3 日間培養後, 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_{90} (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 1/10 に低下させるエンシトレルビルフマル酸の濃度) は，0.0784 µmol/L であった (表 2.6.2.2-2)．ウイルス非感染の細胞に，50 µmol/L のエンシトレルビルフマル酸を 3 日間処置したとき，エンシトレルビルフマル酸非処置群に対し，細胞生存率の低下は 1.75%であり，細胞障害は示さなかった．以上より，エンシトレルビルフマル酸は，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.

表 2.6.2.2-1　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/USA/MI-UM-10052670540/2023	BA.2.86	0.261	0.021	0.877	0.022
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/France/IDF-RELAB-IPP09137/2024	XEC	0.309	0.091	0.946	0.121

SD = standard deviation
The mean and SD were calculated from 3 independent experiments.

表 2.6.2.2-2　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/23-018/2022	XBB.1.5.19	3	EC_{90} (μmol/L)	0.0784	0.0362

The mean and SD were calculated from 3 independent experiments.

2.6.2.2.1.2　リバースジェネティクス由来 SARS-CoV-2 変異体に対する薬剤感受性試験

評価資料 4.2.1.1-05，4.2.1.1-06

参考資料 4.2.1.1-04，4.2.1.1-11

概要表 2.6.3.2.4，2.6.3.2.5，2.6.3.2.6，2.6.3.2.11

エンシトレルビルフマル酸の標的酵素である 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．薬剤感受性試験では，VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて，エンシトレルビルフマル酸の SARS-CoV-2 変異体及び野生型 SARS-CoV-2 による細胞変性抑制効果を検討した．

第 2/3 相試験 (T1221 試験) 及び第 3 相試験 (T1331 試験) では，エンシトレルビルフマル酸投薬後，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に置換が認められた．第 2/3 相試験 (T1221 試験) で認められた，T25A，N 末端側から 25 番目のトレオニンがイソロイシンに置換 (T25I)，N 末端側から 48 番目のアスパラギン酸がチロシンに置換 (D48Y)，M49I，及び第 3 相試験 (T1331 試験) で認められた，T25N 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抗 SARS-CoV-2 活性を評価した．T25A，T25I，D48Y，M49I，T25N 及び E166A 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 14.4 倍，2.86 倍，2.22 倍，5.25 倍，4.84 倍及び 3.39 倍となり，T25A，M49I，T25N 及び E166A に対し，3 倍以上感受性が低下した (表 2.6.2.2-3).

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 変異体について，エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性を評価した．ニルマトレルビルに対する感受性低下責任変異である E166V を伴う，T21I + E166V，N 末端側から 50 番目のロイシンがフェニアルアラニンに置換 (L50F)/E166V 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，2.76 倍，2.81 倍となり，明らかな感受性の低下は認められなかった (表 2.6.2.2-3). T21I + S144A 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 7.29 倍となった．S144A は，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ことから，T21I + S144A も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，L167F, L50F + N 末端側から 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

ルフマル酸に対する感受性の明らかな低下は認められなかった.

表 2.6.2.2-3 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 (1)

Virus (rgSARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020) [a,b]	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
D48Y	2.22	0.970	1.20	ETV	d
M49I	5.25	0.731	0.248	ETV	d
L50F	1.18	0.572	1.34	NTV	d
F140L	< 0.530	0.148	0.287	NTV	e
E166A	3.39	0.776	1.21	NTV	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
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
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 study, 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, 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, L50F = leucine-to-phenylalanine at amino acid position 50, L167F = leucine-to-phenylalanine at amino acid position 167, M49I = methionine-to-isoleucine at amino acid position 49, 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. Data from Study S-217622-EB-214-N [4.2.1.1-05].

e. Data from Study S-217622-EB-221-N [4.2.1.1-06].

* 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.

2.6.2.2.1.3 [redacted]におけるリバースジェネティクス由来 SARS-CoV-2 変異体に対する薬剤感受性試験

評価資料 4.2.1.1-07

概要表 2.6.3.2.7

ニルマトレビル耐性との関連が報告されている SARS-CoV-2 変異体 [1] に対し，エンシトレビルフマル酸の交差耐性を，[redacted]にて in vitro で評価した．本検討では，3CL プロテーゼに変異を有する SARS-CoV-2 変異体を，Ye らの方法に従って作製した [2]．薬剤感受性試験では，ヒト肝癌組織由来細胞株 Huh7 にアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) を発現させた Huh7-ACE2 細胞に対し，SARS-CoV-2 変異体を感染させ，エンシトレビルフマル酸のウイルス増殖に対する阻害効果を検討した．

エンシトレルビルフマル酸は，評価した変異体の増殖を，野生型と同等又はそれ以上の効力で阻害した．評価した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 2.07 倍以下となり，明らかな感受性の低下は認められなかった (表 2.6.2.2-4).

表 2.6.2.2-4　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，ニルマトレルビルの抗ウイルス活性の Fold change (2)

Virus[a,b]	Fold change[c] (relative to wild-type)		
	Ensitrelvir fumaric acid	Nirmatrelvir	Remdesivir
T21I	0.458	0.435	0.575
L50F	1.07	2.12	0.570
E166V	1.04	55.8	0.602
A173V	0.162	0.557	0.662
P252L	1.17	6.82	0.773
T304I	0.713	3.84	0.711
T21I + S144A	2.07	3.14	1.04
T21I + E166V	1.39	278	4.75
T21I + A173V	0.0779	0.820	2.79
T21I + T304I	0.648	7.08	0.590
L50F + E166V	0.260	32.3	4.49
T21I + A173V + T304I	0.0194	0.594	2.51

a. All viruses are in the background of USA-WA1/2020 strain with ORF7a/b deleted and replaced with a NanoLuc reporter gene. Denoted mutations are in 3CL protease.

b. Amino acid substitutions are abbreviated as following. A173V = alanine-to-valine at amino acid position 173; E166V = glutamic acid-to-valine at amino acid position 166, L50F = leucine-to-phenylalanine at amino acid position 50, 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, T304I = threonine-to-isoleucine at amino acid position 304.

c. Fold change was calculated as relative EC_{50} to wild-type.

2.6.2.2.1.4 SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼの遺伝子多型解析

参考資料 4.2.1.1-08

概要表 2.6.3.2.8

これまで，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単数置換 D48G，M49L，P52S，S144A，及び複数置換 (M49L + S144A) が認められている．

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 D48，M49，P52，S144 及び 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ところ，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．

2.6.2.2.2 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予防投与による治療効果

評価資料 4.2.1.1-09

概要表 2.6.3.2.9

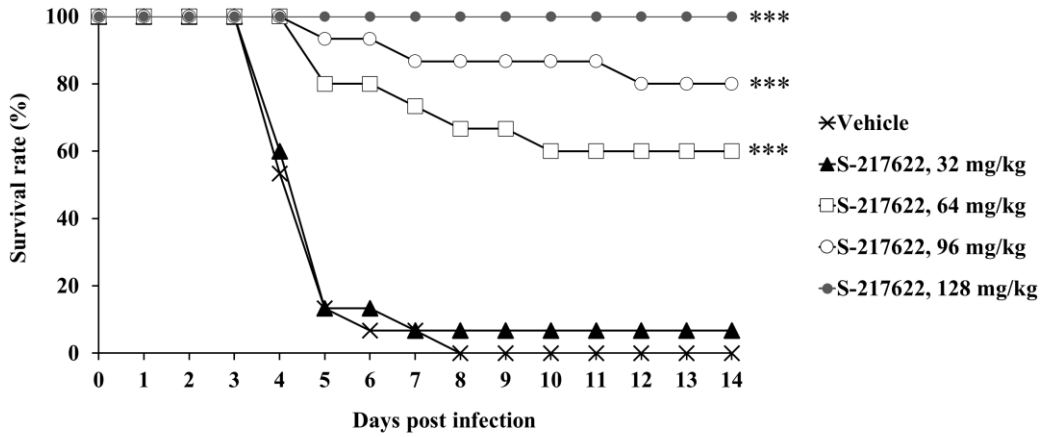
SARS-CoV-2 マウス馴化株 (mouse-adapted hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 [SARS-CoV-2 MA-P10]) を接種させた，致死的感染モデルに対する，エンシトレルビルの予防的効果を評価した．雌性 BALB/c マウスに，SARS-CoV-2 MA-P10 株を 3.00×10^2 組織細胞感染価 ($TCID_{50}$)/マウスで経鼻接種する 24 時間前に，エンシトレルビルを 0 (媒体対照群: 0.5%メチルセルロース水溶液 [MC])，32，64，96 及び 128 mg/kg の用量で単回皮下投与し，感染から 14 日間の体重変化率 (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．

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 (図 2.6.2.2-1)．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 (図 2.6.2.2-2)．以上より，感染 24 時間前にエンシトレルビルを 64，96 及び 128 mg/kg の用量で投与した場合，媒体対照群と比較して生存期間が有意に延長し，体重減少が抑制した．

雌性 BALB/c マウスにエンシトレルビルを 32, 64, 96 及び 128 mg/kg の用量で単回皮下投与後，投与 168 時間までの血漿中エンシトレルビル濃度を測定した．エンシトレルビルの 32～128 mg/kg の単回皮下投与の範囲において，血漿中エンシトレルビルの濃度は用量比以下で増加し，投与後 24 時間の血漿中濃度 (C_{24hr}) は，投与量 32，64，96 及び 128 mg/kg の用量で，それぞれ 1740，2990，3110 及び 3370 ng/mL であることが示された (表 2.6.2.2-5)．

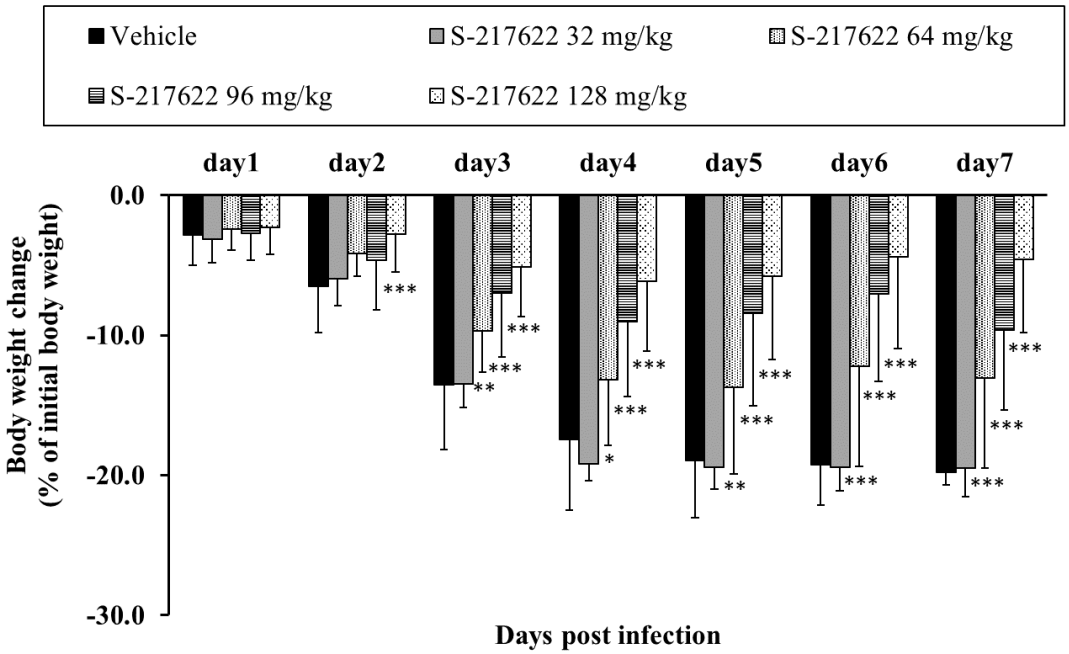
以上から，SARS-CoV-2 感染時点で有意な予防効果を発揮するために必要なエンシトレルビルの最小血漿中濃度は 2990 ng/mL であると考えられた.

図 2.6.2.2-1 エンシトレルビルを感染 24 時間前に単回皮下投与したときの 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



*** denote P < 0.001 vs vehicle using log-rank test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure).
S-217622 in the figure represent ensitrelvir.

図 2.6.2.2-2 エンシトレルビルを感染 24 時間前に単回皮下投与したときの SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおける感染後の体重変化率



*, ** and *** denote respectively P < 0.05, P < 0.01 and P < 0.001 vs vehicle using the one-way analysis of variance model with equal variance assumption including the fixed effect of group and the contrast method (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure).
When the mice died before the analysis time point or the body weight proportion to initial body weight was less than 80%, the body weight proportion of the mouse was imputed as 80% at all time point after that time point.
S-217622 in the figure represent ensitrelvir.

表 2.6.2.2-5 SARS-CoV-2 感染モデルマウスにおけるエンシトレルビルの単回皮下投与後の血漿中エンシトレルビルの血漿中濃度

Time (hour)	Plasma concentrations of ensitrelvir (ng/mL)											
	Dose (mg/kg)											
	32			64			96			128		
0.5	425	±	167	570	±	88	610	±	114	689	±	91
2	1820	±	760	3150	±	1020	3390	±	460	4000	±	960
4	3100	±	1070	4550	±	1390	5490	±	960	6050	±	1030
8	3560	±	1060	4750	±	980	6510	±	1130	6710	±	810
24	1740	±	670	2990	±	550	3110	±	820	3370	±	900
48	1130	±	240	1720	±	520	1400	±	400	1840	±	470
72	946	±	306	1310	±	390	951	±	185	1230	±	230
168	584	±	59	1100	±	260	1110	±	290	1250	±	170

Data are expressed as the mean ± SD of 4 mice.
Concentration of ensitrelvir in mouse plasma was determined by a validated method (S-217622-EB-004-N, 1.13 項 既承認医薬品に係る資料 [通常申請])

2.6.2.2.2.2 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおけるエンシトレルビル予防投与による肺内ウイルス力価への影響

評価資料 4.2.1.1-10

概要表 2.6.3.2.10

SARS-CoV-2 株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ウイルス増加抑制効果を検討した．雌性 BALB/c マウスに，SARS-CoV-2 MA-P10 株を 3.00×10^2 $TCID_{50}$/マウスで経鼻接種する 24 時間前に，エンシトレルビルを 0 (媒体対照群: 0.5% MC)，64 及び 128 mg/kg の用量で単回皮下投与し，感染 1，2，4 及び 9 日後の肺ウイルス力価を測定した．

肺内ウイルス力価は，感染 2 日後に最大に達し，9 日後には，媒体対照群及びエンシトレルビル投与群で，定量下限 (1.80 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL) 付近まで減少した (表 2.6.2.2-6)．感染 9 日後，媒体対照群でのマウスの生存率は 50%以下であった．エンシトレルビル投与群の肺内ウイルス力価は，感染後に評価したすべての時点において，媒体対照群より減少，又は減少する傾向があった．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た．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．

表 2.6.2.2-6 SARS-CoV-2 感染マウスモデルにおいてエンシトレルビルを感染 24 時間前に単回皮下投与したときの肺内ウイルス力価への影響

Sampling time point of lungs (days after infection)	Test substance	Dose (mg/kg)	Number of mice	Virus titers ($\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL)
1	Vehicle	–	10	6.90 ± 0.31
	Ensitrelvir	64	10	6.13 ± 0.43**
		128	10	5.50 ± 0.48**
2	Vehicle	–	10	7.30 ± 0.29
	Ensitrelvir	64	10	6.97 ± 0.33
		128	10	6.78 ± 0.47*
4	Vehicle	–	10	5.94 ± 0.41
	Ensitrelvir	64	10	5.60 ± 0.41
		128	10	5.26 ± 0.34*
9	Vehicle	–	3	1.80 ± 0.00
	Ensitrelvir	64	8	1.80 ± 0.00
		128	9	1.84 ± 0.11

Mice were subcutaneously administered (10 mL/kg × 2 sites) with ensitrelvir or vehicle (0.5 w/v% methylcellulose solution). The administration was performed 24 hours before virus infection. The observations 9 days after infection was excluded from the analysis set of the ANOVA model because three of ten mice survived 9 days after infection in vehicle.

Data are expressed as the mean ± SD of mice in each group.

$TCID_{50}$ = 50% tissue culture infectious dose, SD = standard deviation

* and ** denote $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively, vs vehicle for the pairwise comparison using the one-way analysis of variance model including the fixed effect of group (multiplicity of statistical tests was adjusted using the Dunnett method).

2.6.2.3 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.

2.6.2.4 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.

2.6.2.5 考察及び結論

2.6.2.5.1 効力を裏付ける試験

2.6.2.5.1.1 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) 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.

また，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，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.

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．ニルマトレルビルに対する感受性低下責任変異である E166V を伴う，T21I + E166V, 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．S144A を伴う T21I + S144A 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，2.07 倍~7.29 倍であったが，S144A は低感受性変異であることから，T21I + S144A に対しても，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，L167F，L50F + 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の感受性の明らかな低下は認められなかった.

2.6.2.5.1.2 In vivo 活性

In vivo 評価では，SARS-CoV-2 マウス馴化株を接種させた，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，64 mg/kg の用量では，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，エンシトレルビル投与群の肺内ウイルス力価は，感染後に評価したすべての時点において，媒体対照群より減少，又は減少する傾向があった．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た．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．

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，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．

2.6.2.5.1.3 エンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下

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 T25A，T25I，D48Y，M49I，T25N 及び E166A のアミノ酸変異を有する SARS-CoV-2 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．T25A，T25I，D48Y，M49I，T25N 及び E166A 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 14.4 倍，2.86 倍，2.22 倍，5.25 倍，4.84 倍及び 3.39 倍となり，T25A，M49I，T25N 及び E166A に対し，3 倍以上感受性が低下した．

これまで，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の単数置換 (D48G，M49L，P52S 及び S144A) 及び複数置換 (M49L + S144A) が認められている．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 D48，M49，P52，S144 及び 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ところ，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．

2.6.2.6 図表

図表は本文中の適切な場所に記載した.

2.6.2.7 参考文献

1. Iketani S, Mohri H, Culbertson B, et al. Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. Nature 2023; 613: 558–564.
2. Ye C, Chiem K, Park JG, et al. Rescue of SARS-CoV-2 from a Single Bacterial Artificial Chromosome. mBio. 2020; 11 (5): e02168-20.