2.7.1 生物学的試験及び関連する分析法

目次

略号等一覧 3
1. 背景及び概観 4
1.1. 製剤開発過程 4
1.2. In vitro 溶出データ 6
1.3. 生体試料中薬物濃度分析法 6
1.3.1. バリデーション 7
1.3.2. 分析単位内の QC 試料分析の概要 8
2. 個々の試験結果の要約 9
2.1. 絶対的バイオアベイラビリティ 9
2.2. 相対的バイオアベイラビリティ 9
2.3. 生物学的同等性 11
2.4. バイオアベイラビリティに及ぼす食事の影響 12
3. 全試験を通しての結果の比較と解析 12
3.1. In vitro 溶出性 12
3.2. バイオアベイラビリティ 12
3.3. 食事の影響 12
参考文献一覧 12
4. 付録 13

略号等一覧

略号（略称）	英語	日本語
2'-MOE	2'-*O*-methoxy ethyl	2'-*O*-メトキシエチル
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ASO	antisense oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
AUC(0-inf)	area under the concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinite time	0 時間から無限大時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
CI	confidential interval	信頼区間
Cmax	maximum drug concentration	最高血漿中濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
FTIH	first time in human	-
GMR	ratio of geometric means	幾何平均の比
GSK	GlaxoSmithKline	-
HBs	hepatitis B surface	B 型肝炎ウイルス表面
HBV	hepatitis B virus	B 型肝炎ウイルス
HCP	healthcare professional	医療従事者
HPLC-MS/MS	high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析
ISI	integrated summary of immunogenicity	-
ISR	incurred sample reanalysis	-
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
NA	nucleos(t)ide analogue	核酸アナログ
PD	pharmacodynamic	薬力学
PFS	prefilled syringe	プレフィルドシリンジ
PK	pharmacokinetic	薬物動態
PopPK	population pharmacokinetics	母集団薬物動態
QC	quality control	品質管理
QTc	corrected QT interval	補正 QT 間隔
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
SSD	safety syringe device	安全装置付きシリンジ

1. 背景及び概観

本剤であるベピロビルセンナトリウム（以下、ベピロビルセン又は GSK3228836 と略す）はプレゲノム RNA を含むすべての HBV mRNA を標的とするキメラ型 2’-MOE 修飾ホスホロチオエート ASO であり、リボヌクレアーゼ H を介した mRNA の分解により HBs 抗原等のウイルス蛋白量を低下させる。HBs 抗原等の HBV ウイルス抗原は免疫抑制機能を有し、HBV 特異的な獲得免疫の免疫不応答及び T 細胞疲弊を促進する[Thimme, 2024]。

ベピロビルセンは、ベースラインの HBs 抗原量≤3000 IU/mL の肝硬変のない HBV 持続感染患者の治療薬として開発された。本剤は NA 治療と併用して、期間を限定して投与される。

特に記載のない限り、臨床試験ではベピロビルセンナトリウムとして投与した。投与量及び分析対象物質の濃度は親化合物のベピロビルセンを示す。臨床開発では、ベピロビルセン 150 mg/mL 注射液の単回皮下投与用バイアルを用いた。臨床開発中及び市販予定製剤に処方の変更はないが、ベピロビルセン市販予定製剤の形態は、SSD に PFS を組み込んだコンビネーション製品（PFS SSD）である。PFS SSD により、ベピロビルセン 150 mg を含む注射液 1 mL（150 mg/mL、ベピロビルセン遊離酸として算出）が投与される。

本文書では以下について示す。

- ベピロビルセン市販予定製剤の概要（Section 1.1）
- 血漿中及び尿中ベピロビルセン濃度測定に用いた分析法（Section 1.3.1.1）
- 血清中 ADA 分析法（Section 1.3.1.2）
- ベピロビルセンのバイアル投与又は PFS SSD 投与（いずれも皮下投与）が臨床的に同様であることをサポートする相対的バイオアベイラビリティ試験（219239 試験）の結果の要約（Section 2.2）

すべての臨床試験の一覧を、製品開発の根拠及び背景とともに m5.2 に示す。

ベピロビルセン 150 mg/mL 注射液の生物薬剤学的特性の要約を以下に示す。

- 市販予定製剤をバイアルから PFS SSD に変更するが、処方は変更していない。
- 血漿中及び尿中ベピロビルセン濃度分析法、並びに血清中抗ベピロビルセン抗体分析法はバリデートされており、直線性、感度、選択性、真度、精度及び再現性が確認された。
- 相対的バイオアベイラビリティ試験から、ベピロビルセンの曝露量はバイアル投与と PFS SSD 投与で同程度であり、ベピロビルセンの製剤をバイアルから PFS SSD へ変更することを支持する結果であった。また、市販予定製剤（PFS SSD）の自己投与の選択肢をサポートするものであった。

1.1. 製剤開発過程

ベピロビルセン 150 mg/mL 注射液は、無菌で無色～黄色の澄明の溶液であり、原則として目視できる粒子を含まない。投与経路は皮下投与である。投与前の調製又は希釈は不要である。

製剤の原薬として、十分な溶解性及び安定性を有するベピロビルセンナトリウムを選択した。ベピロビルセンナトリウムは[redacted]である。また、[redacted]固体であり、水に容易に溶解するため、注射液の製造に適している。

ベピロビルセン注射液は、ベピロビルセン 150 mg/mL（遊離酸として算出）を含む注射用水を[redacted]及び／又は[redacted]で pH を調整した製剤である。臨床開発中及び市販予定製剤に処方の変更はない。製剤設計の詳細を製剤開発の経緯（m3.2.P.2.2, 製剤）に示す。

ベピロビルセン 150 mg/mL 注射液のバイアル製剤は、開発初期の PK 試験及び臨床試験で用いられ、主要な臨床試験でも引き続き用いられた。

ベピロビルセン 150 mg/mL 注射液の市販予定製剤は、注射針保護装置付き SSD に PFS を組み込んだコンビネーション製品（PFS SSD）である。本剤は単回投与用であり、ベピロビルセン 150 mg を含む注射液 1 mL を皮下投与する。ベピロビルセンの臨床用量は 300 mg であり、150 mg/mL 注射液を 2 回皮下投与する。

PFS の接薬部（ガラス製バレル及びゴム栓）には、バイアル製剤の接薬部と[redacted]を用いる。ベピロビルセン 150 mg/mL 注射液は PFS との適合性を有することが示されており、詳細を製剤開発の経緯（m3.2.P.2.4, 容器及び施栓系）に示す。PFS との適合性は、ベピロビルセン 150 mg/mL 注射液 PFS SSD の安定性データから裏付けられており（m3.2.P.8, 安定性）、バイアル及び PFS SSD のベピロビルセン注射液が同等の安定性を有することが示されている。

ベピロビルセン 150 mg/mL 注射液 PFS SSD の、患者の利便性及び機器の機能性が適正であることを示した試験を製剤開発の経緯（m3.2.P.2.4, 容器及び施栓系）に示す。

ベピロビルセン注射液のバイアル製剤及び PFS SSD 製剤の性能を評価するため、相対的バイオアベイラビリティ試験（219239 試験）を実施した。本試験の詳細及び結果を Section 2.2 に示す。主要な臨床試験［202009 試験（B-Well 1 試験）及び 219288 試験（B-Well 2 試験）］、相対的バイオアベイラビリティ試験（219239 試験）で用いた製剤並びに安定性基準ロットの剤形及び処方を表 1 に示す。

表 1　Bepirovirsen Solution for Injection Formulation Used in Pivotal Clinical Trials and Primary Stability Studies

Presentation	Vial	Vial	Vial and PFS SSD [2]	PFS SSD [2]
Clinical Trial Study/Registration Stability batch	Pivotal (B-Well 1)	Pivotal (B-Well 2)	Relative bioavailability study (Study 219239)	Primary stability
Component	Quantity (mg/mL)			
Active Component Bepirovirsen sodium Inactive Components [redacted] [redacted] Water for Injection	150.0 mg [1] q.s.[3] to [redacted] q.s.[3] to [redacted] q.s.[3] to [redacted]			
Total Unit Dose (mL)	1.0			

Note:
1. Stated quantity is bepirovirsen free acid.
2. PFS: prefilled syringe; SSD: safety syringe device.
3. q.s.: Quantum Satis, which means to add an amount sufficient to reach the target concentration.

臨床試験で用いた原薬及び製剤の要約を表 7 に示す。

1.2. In vitro 溶出データ

ベピロビルセン注射液は皮下投与されるため、in vitro 溶出試験を実施していない。

1.3. 生体試料中薬物濃度分析法

薬物動態解析のための生体試料中薬物濃度分析法

ベピロビルセンの臨床開発をサポートするため、ヒト血漿中及び尿中ベピロビルセン並びにその N-アセチルガラクトサミン結合 ASO である GSK3389404 分析法バリデーション／適格性評価及び実試料分析を、Tandem Labs 社（米国）、Labcorp 社（旧 Covance 社、中国）及び Labcorp 社（英国）の計 3 ヵ所で実施した。

ヒト血漿中及び尿中ベピロビルセン分析法を開発した。本分析法の適切な定量範囲で直線性、感度、選択性、精度及び真度が確認、バリデートされた。すなわち、臨床開発プログラムで実施した臨床試験から得られた試料中のベピロビルセンの定量に用いた本分析法が、信頼性及び再現性を有することが示された。

- Tandem Labs 社では、ヒト血漿中ベピロビルセンの分析に、蛍光検出を用いたハイブリダイゼーション ELISA 法を使用した。Labcorp 社では、液-液抽出で試料から不純物を除去した後、HPLC-MS/MS 法を使用した。血漿中ベピロビルセンの長期保存安定性及び前処理後試料中安定性を確認した。分析法及びバリデーションの詳細、並びに各分析法を用いた試験を以下に要約し、その一覧を表 8 に示す。
- 尿中ベピロビルセンの分析には、蛍光検出を用いたハイブリダイゼーション ELISA 法を使用した。分析法及び適格性評価の詳細、並びに本分析法を用いた試験を以下に要約し、その一覧を表 8 に示す。

抗薬物抗体分析

GSK 社（米国）は、サンドイッチ ELISA 法を用いたヒト血清中抗ベピロビルセン抗体分析法を開発・バリデートした。その後、本測定法を Labcorp 社（中国）に移管した。分析法及びバリデーションの詳細を以下に要約し、その一覧を表 10 及び表 11 に示す。

分析法バリデーション報告書は m5.3.1.4 に含めた。

1.3.1. バリデーション

1.3.1.1. ヒト生体試料中ベピロビルセン分析法バリデーション

血漿中ベピロビルセン濃度分析法が Tandem Labs 社で開発・バリデートされた。定量範囲は 1.000～100.0 ng/mL であった。本分析法（TCAM-101）には、蛍光検出を用いたハイブリダイゼーション ELISA 法を採用した。本分析法を、健康被験者を対象にベピロビルセンを単回及び反復投与した FTIH 試験［213725 試験（旧称 ISIS 505358-CS1 試験）］の試料分析に用いた。本分析法バリデーション結果を表 8 に示す。

HPLC-MS/MS 法を用いた血漿中ベピロビルセン及び GSK3389404 濃度分析法が Labcorp 社（中国）で開発・バリデートされた。定量範囲は 1.00～1000 ng/mL であった。本分析法（G836HPP）は、液-液抽出後の試料を HPLC-MS/MS（エレクトロスプレーイオン化インターフェース及び多重反応モニタリング）で分析するものであり、内標準物質にはベピロビルセン及び GSK3389404 の類似体である ISIS440762 を用いた。本分析法を、第 2 相試験［205695 試験（旧称 ISIS 505358-CS3 試験）］の実試料分析に用いた。その後の臨床開発過程で、分析対象物質をベピロビルセンのみとし（分析法 G322HPP）、分析法 G836HPP と G322HPP をブリッジングするためのパーシャルバリデーションを実施した。G322HPP を、第 1 相～第 3 相試験［219239 試験、205871 試験（B-Assured 試験）、209668 試験（B-Clear 試験）、209348 試験（B-Together 試験）、212602 試験（B-Fine 試験）、B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験］の実試料分析に用いた。バリデーションの結果を表 8 に示す。

Labcorp 社（中国）でバリデートした分析法 G322HPP を、その後 Labcorp 社（英国）に移管した。両施設間で、分析法 G322HPP のクロスバリデーションを実施した。Labcorp 社（英国）に移管した G322HPP を、第 1 相試験［205873 試験（QTc 試験）］の実試料分析に用いた。クロスバリデーションの結果を表 8 に示す。

ヒト尿中ベピロビルセン（ISIS 505358）濃度分析法が Tandem Labs 社で開発され、適格性が確認された。定量範囲は 2.000～100.0 ng/mL であった。本分析法（TCAM-106）には、蛍光検出を用いたハイブリダイゼーション ELISA 法を採用した。本分析法を、健康被験者を対象にベピロビルセンを単回及び反復投与した FTIH 試験（213725 試験）の実試料分析に用いた。適格性評価の結果を表 8 に示す。

1.3.1.2. ヒト血清中抗ベピロビルセン抗体分析法バリデーション

サンドイッチ ELISA 法を用いたヒト血清中抗ベピロビルセン抗体分析法を GSK 社（米国）で開発・バリデートした。抗ベピロビルセン抗体をベピロビルセンで捕捉し、ペルオキ

シダーゼ標識タンパク質 A/G で検出するサンドイッチ法を用いた。本測定法の概要を表 2 に示し、バリデーションデータの包括的な概要を表 10 に示す。

バリデーション完了後、モノクローナル抗体陽性対照を新たに使用するため、パーシャルバリデーションを実施した。判定基準を満たしたすべての分析単位を用いて、新ロットを使用する際に適用する判定基準を設定した。また、試料分析を singlicate で実施することの妥当性を統計的に評価した（m5.3.5.3 ISI）。

表 2　Summary of Anti-Drug Antibody Assay Method - GSK, USA

Method name	ELISA method to detect anti-bepirovirsen antibodies in human serum GSK3228836HUSE_ADA_A_VAL v1.0 (original validation) GSK3228836HUSE_ADA_A_VAL v2.0 (partial validation)
GSK Validation Report number	2022N502219_01 2022N501750_00 (original validation) 2024N554074_00 (partial validation)
Laboratory	GSK, USA
Studies supported	GSK3228836HUSE_ADA_A v01: 205871 (B-Assured) GSK3228836HUSE_ADA_A v02: 219239 202009 (B-Well 1) 219288 (B-Well 2)

中国で実施する試験のため、抗ベピロビルセン抗体分析法を Labcorp 社（中国）に移管した。本分析法の概要を表 3 に示し、バリデーションデータの包括的な概要を表 11 に示す。

表 3　Summary of Anti-Drug Antibody Assay Method - Labcorp Shanghai, China

Method name	ELISA method for determination of antibodies to GSK3228836 in human serum (ICSH 24-121)
GSK Validation Report number	2025N565779_00
Laboratory	Labcorp, Shanghai, China
Studies supported	202009 (B-Well 1) 219288 (B-Well 2)

1.3.2.　分析単位内の QC 試料分析の概要

1.3.2.1.　ヒト血漿中ベピロビルセン定量時の QC 試料分析の概要

PK を評価する臨床試験において、分析対象物質ごとに 3 又は 4 濃度の QC 試料を実試料とともに保管した。その後、別途調製した検量線用標準試料から作成した検量線で定量した。分析単位採用の判定基準は、すべての QC 試料の 3 分の 2 以上、かつ各濃度の QC 試料の 50%以上の測定値が理論濃度の±15%以内とした。各試験で報告されたデータについて、対象となる分析単位はすべて事前に規定した判定基準を満たした。各試験における QC 試料全体の真度及び精度を表 9 に示す。

臨床試験から得られた実試料を用いて、ベピロビルセンの ISR を実施した。結果の一覧を表 9 に示す。ISR の結果の 3 分の 2 以上が、再分析結果及びそれに対応する初回分析結果の平均値の±20%の範囲内であり、ヒト血漿中ベピロビルセンの実試料測定値の再現性が示された。

1.3.2.2. 血清中抗ベピロビルセン抗体分析時の QC 性能の概要

B-Assured 試験、219239 試験、B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験の実試料を、バリデート済みの分析法（GSK3228836HUSE_ADA_A_VAL）を用いて GSK 社（米国）で分析した。中国で実施した B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験の実試料については、バリデートされた分析法（ICSH 24-121）を用いて Labcorp 社（中国）で分析した。試料の分析結果は、表 12 に示した各報告書に要約した。

ADA を評価した各臨床試験において、高濃度及び低濃度の陽性対照を実試料とともに保管し、スクリーニングアッセイ、確認アッセイ及び抗体価測定時に実試料とともに分析した。対照試料が事前に規定した判定基準を満たした場合、分析が適切であったと判断した。各試験で報告されたデータについて、対象となる分析単位はすべて事前に規定した判定基準を満たした。各試験における QC 試料全体の精度を表 12 に示す。

2. 個々の試験結果の要約

2.1. 絶対的バイオアベイラビリティ

ベピロビルセンの絶対的バイオアベイラビリティを推定するための生物薬剤学試験は実施していない。

2.2. 相対的バイオアベイラビリティ

健康成人被験者を対象に、ベピロビルセンをバイアル及び PFS SSD で皮下投与した時の曝露量を比較する相対的バイオアベイラビリティ試験（219239 試験）を実施した。バイアル及び PFS SSD で、同一の処方及び投与量を用いた（Section 1.1）。

試験の標題：A Phase 1, randomized, open-label, parallel group study to evaluate the relative bioavailability of SC bepirovirsen when delivered from a vial or a PFS fitted with a SSD in healthy adult participants（m5.3.1.2, 219239 試験）

試験デザイン：本試験は、健康成人被験者を対象にベピロビルセンをバイアル及び PFS SSD で単回皮下投与した時の相対的バイオアベイラビリティを評価する、第 1 相、ランダム化、非盲検試験であった。本試験では HCP がバイアル及び PFS SSD でベピロビルセンを皮下投与した時の相対的バイオアベイラビリティ、安全性及び忍容性に加え、被験者が PFS SSD で自己投与した時の操作性も評価した。計 160 例を以下のいずれかの投与群に 3:3:2:2 の比率でランダム化した。Day 1 に、各投与群の被験者にベピロビルセン 300 mg（150 mg を 2 回）を単回皮下投与した。

- 第 1 投与群：HCP がバイアルで投与（46 例）

- 第 2 投与群：HCP が PFS SSD で投与（49 例）
- 第 3 投与群：被験者が HCP からトレーニングを受けた後、PFS SSD で自己投与（32 例）
- 第 4 投与群：被験者が HCP からトレーニングを受けず、PFS SSD で自己投与（33 例）

第 3 及び第 4 投与群の被験者は、HCP の監視下で自己投与した。

第 1 及び第 2 投与群の被験者を、注射部位（上腕部、腹部及び大腿部）別に 1:1:1 の比率でランダム化した。第 3 及び第 4 投与群の被験者を、注射部位（腹部及び大腿部）別に 1:1 の比率でランダム化した。

全被験者から、ベピロビルセン投与前並びに Day 1（投与 1、1.5、2、3、4、5、6、8 及び 12 時間後）、Day 2（24 時間後）、Day 3（48 時間後）、Day 4（72 時間後）、Day 8（168 時間後）、Day 15（336 時間後）、Day 29（672 時間後）、Day 43（1008 時間後）、及び Day 64（1512 時間後）に PK 検体を採取した。ベピロビルセンの AUC(0-inf)及び Cmax をノンコンパートメント解析で算出した。PK パラメータについて、固定効果モデルを用いて相対的バイオアベイラビリティを評価した。固定効果には、共変量として投与群、注射部位及び体重を用いた。

結果：第 1 投与群におけるバイアル投与と第 2 投与群における PFS SSD 投与（いずれも HCP が皮下投与）の比較で、ベピロビルセンの曝露量は生物学的に同等であった。Cmax 及び AUC(0-inf)の GMR の 90% CI は、いずれも標準的な生物学的同等性の判定基準である 0.80～1.25 の範囲内であった（表 4）。

第 2 投与群における PFS SSD を用いた HCP による投与と第 3 及び第 4 投与群における被験者の自己投与（トレーニングあり・なし）の比較で、ベピロビルセンの曝露量は生物学的に同等であった。Cmax 及び AUC(0-inf)の GMR の 90% CI はいずれも 0.80～1.25 の範囲内であった（表 5、表 6）。

いずれの投与群でも、ベピロビルセンの Cmax は他の部位と比較して大腿部に投与した時で小さかった。一方で、ベピロビルセンを大腿部に投与した時の AUC(0-inf)は、被験者が自己投与した第 3 及び第 4 投与群（トレーニングの有無を問わない）でのみ、他の部位と比較して小さかった。注射部位がベピロビルセンの PK に及ぼす影響について、PopPK モデルで共変量として評価した結果、注射部位は曝露量に対する有意な共変量として特定されなかった。したがって、PK-PD 関係のデータに基づくと、注射部位による曝露量の差は臨床的に重要ではないと考えられた（m2.7.2, Section 3.4.1; m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report）。

表 4 Summary of Relative Bioavailability Results for PFS SSD vs. Vial Administered by HCP

PK Parameter	Geometric Mean Vial (Reference) (N=46)	Geometric Mean PFS SSD (Test) (N=49)	GMR (90% CI) Test/Reference
Cmax (ng/mL)	9954.89	10163.74	1.02 (0.91, 1.14)
AUC(0-inf) (h*ng/mL)	112495.66	118622.59	1.05 (0.96, 1.15)

Source: m5.3.1.2, 219239 CSR, Table 4.13
CI=confidence interval; GMR=geometric mean ratio; HCP=healthcare professional; PFS=prefilled syringe; SSD=safety syringe device.

表 5 Summary of Relative Bioavailability Results for PFS SSD Self-Administered Post-Training vs. Administered by HCP

PK Parameter	Geometric Mean PFS SSD by HCP (Reference) (N=49)	Geometric Mean PFS SSD by Self Admin Post-Training (Test) (N=29)	GMR (90% CI) Test/Reference
Cmax (ng/mL)	10225.39	10421.21	1.02 (0.88, 1.18)
AUC(0-inf) (h*ng/mL)	120034.02	117805.29	0.98 (0.88, 1.09)

Source: m5.3.1.2, Study 219239 CSR, Table 4.15
CI=confidence interval; GMR=geometric mean ratio; HCP=healthcare professional; PFS=prefilled syringe; SSD=safety syringe device.

表 6 Summary of Relative Bioavailability Results for PFS SSD Self-Administered Without Training vs. Administered by HCP

PK Parameter	Geometric Mean PFS SSD by HCP (Reference) (N=49)	Geometric Mean PFS SSD by Self Admin Without Training (Test) (N=29)	GMR (90% CI) Test/Reference
Cmax (ng/mL)	10007.69	9896.63	0.99 (0.87, 1.13)
AUC(0-inf) (h*ng/mL)	117938.68	114492.19	0.97 (0.87, 1.08)

Source: m5.3.1.2 Study 219239 CSR, Table 4.17
CI=confidence interval; GMR=geometric mean ratio; HCP=healthcare professional; PFS=prefilled syringe; SSD=safety syringe device.

結論：

- バイアル投与と PFS SSD 投与（いずれも皮下投与）の比較で、ベピロビルセンの曝露量は生物学的に同等であった。
- PFS SSD を用いた HCP による投与と被験者の自己投与（トレーニングの有無を問わない）の比較で、ベピロビルセンの曝露量は生物学的に同等であった。
- 本試験から、ベピロビルセンの製剤をバイアルから PFS SSD へ変更すること、及び自己投与の選択肢がサポートされた。

2.3. 生物学的同等性

生物学的同等性試験は実施していない。

2.4. バイオアベイラビリティに及ぼす食事の影響

ベピロビルセンは皮下投与されるため、食事の影響を評価する試験を実施していない。

3. 全試験を通しての結果の比較と解析

3.1. In vitro 溶出性

ベピロビルセンは皮下投与用注射液であるため、in vitro 溶出試験を実施していない。

3.2. バイオアベイラビリティ

健康成人被験者を対象としたベピロビルセンのバイアル及び PFS SSD 投与の相対的バイオアベイラビリティ試験（219239 試験）の詳細を Section 2.2 に示す。本試験以外にベピロビルセンのバイオアベイラビリティ試験を実施していない。

3.3. 食事の影響

ベピロビルセンは皮下投与されるため、食事の影響を評価する試験を実施していない。

参考文献一覧

Thimme R, Bertoletti A, Iannacone M. Beyond exhaustion: the unique characteristics of CD8(+) T cell dysfunction in chronic HBV infection. Nat Rev Immunol. 2024;24(11):775-6.

4. 付録

表 7　Summary of Drug Substance and Drug Product used in Clinical Studies

Study Number Study Identifier	Drug Product Batch Number	Presentation	Input Drug Substance Batch	CTD Report Location
213725 (FTIH study formerly ISIS 505358-CS1)	[redacted]	Vial	[redacted]	m5.3.3.1
205871 (B-Assured)		Vial		m5.3.3.3
219239 (Relative Bioavailability Study)		Vial		m5.3.1.2
		PFS SSD		
205695 (Phase 2 Study formerly ISIS 505358-CS3)		Vial		m5.3.4.2
209668 (B-Clear)		Vial		m5.3.5.1
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		
212602 (B-Fine)		Vial		m5.3.5.2
209348 (B-Together)		Vial		m5.3.5.1

Study Number Study Identifier	Drug Product Batch Number	Presentation	Input Drug Substance Batch	CTD Report Location
217023 (TH-HBV-ASO-001)	[redacted]	Vial	[redacted]	m5.3.5.4
		Vial		
202009 (B-Well 1)		Vial		m5.3.5.1
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		
219288 (B-Well 2)		Vial		m5.3.5.1
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		
		Vial		

Study Number Study Identifier	Drug Product Batch Number	Presentation	Input Drug Substance Batch	CTD Report Location
	[redacted]	Vial	[redacted]	
		Vial		
		Vial		
		Vial		

Note: 1 Batch [redacted] was manufactured at [redacted].

表 8 Bioanalytical Methods Summary

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
2018N354873_00 (Bepirovirsen and GSK3389404 in plasma)	205695 205871 (B-Assured) 209668 (B-Clear) 209348 (B-Together) 212602 (B-Fine) 219239 202009 (B-Well 1) 219288 (B-Well 2)	G836HPP (Labcorp Shanghai site) – Full Validation Bepirovirsen was extracted from 100 µL of human plasma by liquid-liquid extraction using an analog internal standard ISIS440762. Extracts were analyzed by HPLC-MS/MS using an Electrospray-ionization interface and multiple reaction monitoring.	
		LLQ	1.00 ng/mL
		Validated Range	1.00 to 1000 ng/mL
		Calibration Curve Precision (%CV)	1.0% to 6.1%
		Calibration Curve Accuracy (%Bias)	-3.9% to 2.5%
		Within-Run Precision (%CV)	1.7% to 15.0%
		Between-Run Precision (%CV)	2.2% to 12.8%
		Within-Run Accuracy (%Bias)	-3.6% to 17.0%
		Between-Run Accuracy (%Bias)	0.2% to 6.0%
		Stability	Processed sample stability: 164 hours at room temperature. Freeze-thaw matrix stability: 5 cycles from -10°C to -30°C and -60°C to -80°C to room temperature Room temperature matrix stability: 24 hours at room temperature

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
			Whole blood stability: 2 hours at room temperature; 2 hours on wet ice. Matrix Frozen stability: 168 days at -10°C to -30°C and -60°C to -80°C
		Selectivity and Matrix Effect	No unacceptable interferences at the retention times of bepirovirsen and its internal standard were observed. 6 matrix lots: 5.3% CV at LLOQ, acceptable
		Interference and Specificity	No Interference in selectivity blanks. Specificity: NR
		Hemolysis Effect	No effect from hemolysis on the quantitation of bepirovirsen.
		Lipemic Effect	No effect from lipemia on the quantitation of bepirovirsen.
		Dilution Linearity	20-fold at 10000 ng/mL
		Parallelism	NA
		Carryover	The carryover within the chromatographic regions of the analytes was observed and was mitigated. No evidence of carryover within the chromatographic regions of ISTD.
2019N404947_00 (Bepirovirsen and GSK3389404 in Plasma)	205695 205871 (B-Assured) 209668 (B-Clear) 209348 (B-Together) 212602(B-Fine) 219239 202009 (B-Well 1) 219288 (B-Well 2)	G836HPP (Labcorp Shanghai site) – Addendum 1 Bepirovirsen was extracted from 100 µL of human plasma by liquid-liquid extraction using an analog internal standard ISIS440762. Extracts were analyzed by HPLC-MS/MS using an Electrospray-ionization interface and multiple reaction monitoring.	
		LLQ	1.00 ng/mL
		Validated Range	1.00 to 1000 ng/mL
		Stability	Matrix Frozen stability: 653 days at -10°C to -30°C and -60°C to -80°C
2018N354873_01 (Bepirovirsen and GSK3389404 in Plasma)	205695 205871 (B-Assured) 209668 (B-Clear) 209348 (B-Together)	G836HPP_G322HPP (Labcorp Shanghai site) – Addendum 2 Partial Validation Bepirovirsen was extracted from 100 µL of human plasma by liquid-liquid extraction using an analog internal standard ISIS440762. Extracts were analyzed by HPLC-MS/MS using an Electrospray-ionization interface and multiple reaction monitoring.	

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
	212602(B-Fine) 219239 202009 (B-Well 1) 219288 (B-Well 2)	• Matrix Selectivity • Bridging Test (From method G836HPP to G322HPP) • Method Transfer (From Shanghai SIMZ to Shanghai Aland) • Dilution QC	
		LLQ	1.00 ng/mL
		Validated Range	1.00 to 1000 ng/mL
		Selectivity and Matrix Effect	6 matrix lots: 11.8% CV at LLOQ, acceptable
		Carryover	There was no evidence of carryover within the chromatographic regions of the analyte and ISTD except for Run 19, 20 and 23
		Qualification Calibration Curve Precision (%CV) Qualification Calibration Curve Accuracy (%Bias) Qualification QC Precision (%CV) Qualification QC Accuracy (%Bias)	2.4% to 6.0% -2.2% to 2.0% 2.3% to 11.2% -2.7% to 1.0%
2024N560732_00 2024N560732_01 (Bepirovirsen in Plasma)	205695 205871 (B-Assured) 209668 (B-Clear) 209348 (B-Together) 212602(B-Fine) 219239 202009 (B-Well 1) 219288 (B-Well 2)	G836HPP_G322HPP (Labcorp Shanghai site) - M10 update Bepirovirsen was extracted from 100 µL of human plasma by liquid-liquid extraction using an analog internal standard ISIS440762. Extracts were analyzed by HPLC-MS/MS using an Electrospray-ionization interface and multiple reaction monitoring	
		LLQ	1.00 ng/mL
		Validated Range	1.00 to 1000 ng/mL
		Calibration Curve Precision (%CV)	0.7% to 3.7%
		Calibration Curve Accuracy (%Bias)	-6.6% to 6.8%
		Carryover	There was no evidence of carryover within the chromatographic regions of the analytes and internal standard.
		Interference	No significant interference in the chromatographic regions of analytes and internal standard.
		Dilution	800 ng/mL at 2-fold dilution confirmed. 10000 ng/mL at 20- and 50-fold dilution confirmed.

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
			100000 ng/mL at 200-fold dilution confirmed
		Selectivity and Matrix Effect	One hemolyzed lot One hyperlipemic lot 6 different normal matrix lots: ≤12.2% CV One Chinese matrix lot: ≤3.6% CV All matrices tested have no significant interference in the chromatographic regions of analyte and internal standard.
		Stability	Whole blood stability: 3 and 4 hours at room temperature Matrix Bench-Top Stability for DQC: 26 hours at room temperature Matrix Freeze-Thaw Stability for DQC: 6 cycles at -10°C to -30°C 6 cycles at -60°C to -80°C Reinjection Reproducibility: 316 hours at room temperature Matrix Frozen Stability: DQC: 345 days at -10ºC to -30ºC and 1278 days at -60ºC to -80ºC
2023N545218_00 (Bepirovirsen in Plasma)	205695 205871 (B-Assured) 209668 (B-Clear) 209348 (B-Together) 212602 (B-Fine) 219239 202009 (B-Well 1) 219288 (B-Well 2)	G322HPP (Labcorp Shanghai site) Bepirovirsen was extracted from 100 µL of human plasma by liquid-liquid extraction using an analog internal standard ISIS440762. Extracts were analyzed by HPLC-MS/MS using an Electrospray-ionization interface and multiple reaction monitoring. Cross-validation assessment between Labcorp Shanghai (originator site) and Labcorp Harrogate (comparator site) was reported. - Cross-validation samples are considered acceptable if % CV is ≤15.0% and mean bias values are within ±15.0% of the nominal concentration for each QC level. The cross-validation results compared passed the acceptance criteria: 1.9 to 4.7 %CV, 5.7 to 14.4% Bias (Shanghai), 1.6 to 4.1 %CV, -5.9 to 3.4% Bias (Harrogate, 2023N544702_01).	

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
		LLQ	1.00 ng/mL
		Validated Range	1.00 to 1000 ng/mL
2023N531482_00 2023N531482_01 (Bepirovirsen in Plasma)	205873 (QTc)	G836HPP_G322HPP (Labcorp Harrogate site) Bepirovirsen was extracted from 100 µL of human plasma by liquid-liquid extraction using an analog internal standard ISIS440762. Extracts were analyzed by HPLC-MS/MS using an Electrospray-ionization interface and multiple reaction monitoring	
		LLQ	1.00 ng/mL
		Validated Range	1.00 to 1000 ng/mL
		Calibration Curve Precision (%CV)	2.6% to 7.6%
		Calibration Curve Accuracy (%Bias)	-5.0% to 4.8%
		Within-Run Precision (%CV)	1.2% to 9.8%
		Between-Run Precision (%CV)	3.5% to 9.2%
		Within-Run Accuracy (%Bias)	-6.3% to 11.1%
		Between-Run Accuracy (%Bias)	-0.4% to 5.6%
		Carryover	Interference peaks >20.0% of the peak area of the mean utilized LLOQ were observed at the retention time of Bepirovirsen. The carryover observed was not significant and did not affect the integrity of the data generated. There was no evidence of carryover within the chromatographic regions of the internal standard.
		Dilution Linearity	20-fold and 50-fold at 10000 ng/mL confirmed 2-fold at 800 ng/mL confirmed
		Matrix Selectivity and Matrix Effect	6 normal matrix lots: ≤5.5%CV at LQC; ≤5.9%CV at HQC, acceptable Matrix effect in Hemolyzed lot: ≤2.9%CV ; ≤14.5% bias Matrix effect in Hyperlipidemic lot: ≤3.6% CV; ≤11.3% bias
		Effect of Analytes Not Measured with the Assay (Co-admin)	≤5.2% CV; ≤1.3% bias

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
		Stability	Reinjection reproducibility: 103 hours at room temperature Bench-Top Stability (Bepirovirsen only and with GSK3965193): 24 hours at room temperature Freeze-Thaw Stability (Bepirovirsen only and with GSK3965193): 5 cycles at -10ºC to -30ºC / -50ºC to -90ºC Matrix Frozen stability of bepirovirsen only: 93 days at -10ºC to -30ºC and 175 days at -60ºC to -80ºC Matrix Frozen stability of bepirovirsen with GSK3965193 93 days at -10ºC to -30ºC and 175 days at -60ºC to -80ºC Sample Collection Stability: 4 hours at room temperature and wet ice
2023N544702_01 (Bepirovirsen in Plasma)	205873 (QTc)	G322HPP (Labcorp Harrogate site) Bepirovirsen was extracted from 100 µL of human plasma by liquid-liquid extraction using an analog internal standard ISIS440762. Extracts were analyzed by HPLC-MS/MS using an Electrospray-ionization interface and multiple reaction monitoring. Cross-validation assessment between Labcorp Harrogate (comparator site) and Labcorp Shanghai (originator site) and was reported. - Cross-validation samples are considered acceptable if % CV is ≤15.0% and mean bias values are within ±15.0% of the nominal concentration for each QC level. The cross-validation results compared passed the acceptance criteria: 1.9 to 4.7 %CV, 5.7 to 14.4% Bias (Shanghai), 1.6 to 4.1 %CV, -5.9 to 3.4% Bias (Harrogate).	
		LLQ	1.00 ng/mL
		Validated Range	1.00 to 1000 ng/mL
		Calibration Curve Precision (%CV)	0.5% to 12.9%

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
		Calibration Curve Accuracy (%Bias)	-6.0% to 4.0%
		Between-Run Precision (%CV)	0.6% to 4.0%
		Between-Run Accuracy (%Bias)	-1.1% to 3.5%
2022N520217_00 (Bepirovirsen/Entecavir/Tenofovir in Plasma)	205695 209668 (B-Clear)	Entecavir method: ENTVHPC (Labcorp Shanghai site) Entecavir was extracted from 100 µL of human plasma by solid phase extraction using a stable labeled internal standard [$^{13}C_2$, ^{15}N]- Entecavir. Extracts were analyzed by HPLC-MS/MS using an Electrospray-ionization interface and multiple reaction monitoring. Tenofovir method: TNENHPC (Labcorp Shanghai site) Tenofovir was extracted from 50.0 µL of human plasma by protein precipitation extraction using a stable labeled internal standard d_7-Tenofovir. Extracts were analyzed by HPLC-MS/MS using an Electrospray-ionization interface and multiple reaction monitoring. Bepirovirsen method: G322HPP (Labcorp Shanghai site) Bepirovirsen was extracted from 100 µL of human plasma by liquid-liquid extraction using an analog internal standards ISIS440762. Extracts were analyzed by HPLC-MS/MS using an Electrospray-ionization interface and multiple reaction monitoring.	
		LLQ	Entecavir: 0.0400 ng/mL Tenofovir:1.00 ng/mL Bepirovirsen: 1.00 ng/mL
		Validated Range	Entecavir: 0.0400 to 16.0 ng/mL Tenofovir:1.00 to 500 ng/mL Bepirovirsen: 1.00 to 1000 ng/mL
		Calibration Curve Precision (%CV)	Entecavir: 3.0% to 8.8% Tenofovir: 2.8% to 5.3% Bepirovirsen: 2.3% to 5.5%
		Calibration Curve Accuracy (%Bias)	Entecavir: -4.4% to 2.3% Tenofovir: -0.9% to 1.6% Bepirovirsen: -1.5% to 2.0%
		Within-Run Precision (%CV)	Entecavir: 1.2% to 2.5% Tenofovir: 3.5% to 7.6% Bepirovirsen: 1.3% to 9.3%

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
		Between-Run Precision (%CV)	Entecavir: 1.9% to 5.1% Tenofovir: 3.3% to 7.6% Bepirovirsen: 1.9% to 8.2%
		Within-Run Accuracy (%Bias)	Entecavir: -4.4% to 8.3% Tenofovir: -5.0% to 6.3% Bepirovirsen: -14.7% to 13.0%
		Between-Run Accuracy (%Bias)	Entecavir: -2.2% to 3.4% Tenofovir: -5.0% to 1.0% Bepirovirsen: -5.7% to 6.0%
		Stability	Entecavir in the presence of Bepirovirsen, Tenofovir, Telbivudine, Adefovir and Lamivudine: Bench-top stability: 24 hours at room temperature Matrix Freeze-Thaw stability: 5 cycles at -10°C to -30°C and -60°C to -80°C Matrix Frozen Stability: 496 days at -10°C to -30°C and -60°C to -80°C Tenofovir in the presence of Bepirovirsen, Entecavir, Telbivudine, Adefovir and Lamivudine: Bench-top stability: 24 hours at room temperature Matrix Freeze-Thaw stability: 5 cycles at -10°C to -30°C and -60°C to -80°C Matrix Frozen Stability: 502 days at -10°C to -30°C and -60°C to -80°C Bepirovirsen in the presence of Entecavir, Tenofovir, Telbivudine, Adefovir and Lamivudine: Bench-top stability: 24 hours at room temperature Matrix Freeze-Thaw stability: 5 cycles at -10°C to -30°C and -60°C to -80°C Matrix Frozen Stability:

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
			447 days at -10°C to -30°C and 503 days at -60°C to -80°C Bepirovirsen in the presence of Peg-IFN: Bench-top stability: 25 hours at room temperature Matrix Freeze-Thaw stability: 5 cycles at -10°C to -30°C and -60°C to -80°C
		Effect of Analytes Not Measured with the Assay	Entecavir spiked with Bepirovirsen, Tenofovir, Telbivudine, Adefovir and Lamivudine: acceptable Tenofovir spiked with Bepirovirsen, Entecavir, Telbivudine, Adefovir and Lamivudine: acceptable Bepirovirsen spiked with Entecavir, Tenofovir, Telbivudine, Adefovir and Lamivudine: acceptable
		Interference	Entecavir; Tenofovir; Bepirovirsen: No significant interference in the chromatographic regions of analytes and internal standard.
		Carryover	Entecavir; Tenofovir; Bepirovirsen: No evidence of carryover within the chromatographic regions of the analyte and internal standard

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
2019N419491_00 and Addendum 1 (Bepirovirsen, AKA ISIS 505358 in plasma)	213725 (FTIH study)	TCAM-101 (Tandem Labs) – Full Validation A hybridization ELISA with fluorometric detection assay was validated. 25 µL of human plasma sample was hybridized to a complementary cutting probe. The hybridized solution is then placed in a NeutrAvidin-coated ELISA plate. After binding to the plate, S1 nuclease is added to digest the unhybridized probes. An anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase is used to detect the hybridized analyte by binding to digoxigenin. AttoPhos® is used as a substrate for fluorometric readout.	
		LLQ	1.000 ng/mL
		Validated Range	1.000 to 100 ng/mL

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
		Regression model and weighting	Four Parameter Curve Fit with weighting $1/Y^2$
		Calibration Curve Precision (%CV)	2.6% to 7.5%
		Calibration Curve Accuracy (%Bias)	-5.3% to 5.6%
		Within-Run Precision (%CV)	4.0% to 7.0%
		Between-Run Precision (%CV)	7.3% to 13.2%
		Within-Run Accuracy (%Bias)	-6.7% to 16.2%
		Within-Run Accuracy (%TE)	8.4% to 20.2%
		Between-Run Accuracy (%Bias)	-3.3% to 15.1%
		Between-Run Accuracy (%TE)	8.0% to 28.3%
		Stability	Room temperature matrix stability: 19 hours10 mins at room temperature. Freeze-thaw matrix stability: 6 and 8 cycles from -70°C to room temperature Matrix Frozen stability: 36 days at -70°C 92, 156, 183, 252, 253, 342 and 343 days at -70°C ± 10°C
		Selectivity and Matrix Effect	10 matrix lots: within acceptance criteria of ± 20 for %AR, 88.4% to 113.1%.
		Metabolite cross-reactivity and Interference	ISIS 630182 (5-mer) demonstrated no cross-reactivity ISIS 630180 (10-mer) demonstrated 5.0% cross-reactivity ISIS 630178 (19-mer) demonstrated 9.1% cross-reactivity
		Hemolysis Effect	No Interference at 0.1% to 5% hemolyzed plasma
		Prozone/Hook Effect	Analyzed 40,000 ng/mL undiluted and with at least 6 dilutions at 1:2 (20,000 ng/mL) 1:4 (10,000 ng/mL) 1:8 (5,000 ng/mL) 1:40 (1,000 ng/mL) 1:80 (500 ng/mL) 1:800 (50.0 ng/mL) 1:1,600 (25.0 ng/mL)

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
			No hook effect observed
		Dilution Linearity	Evaluated by diluting a sample containing 40,000 ng/mL ISIS 505358 at 3 different levels of concentrations (1:500, 1:1,600, 1:10,000). Dilution linearity up to 1:10,000 was demonstrated. %Bias: -10.1% to -6.5% %CV: 1.6% to 7.6% across all diluted samples.
		Parallelism	NA
2019N418874_00 (Bepirovirsen in urine)	213725 (FTIH study)	TCAM-106 (Tandem Labs) – Qualification A hybridization ELISA with fluorometric detection assay was qualified. 25 µL of human urine sample was hybridized to a complementary cutting probe. The hybridized solution is then placed in a NeutrAvidin-coated ELISA plate. After binding to the plate, S1 nuclease is added to digest the unhybridized probes. An anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase is used to detect the hybridized analyte by binding to digoxigenin. AttoPhos® is used as a substrate for fluorometric readout.	
		LLQ	2.000 ng/mL
		Validated Range	2.000 to 100 ng/mL
		Regression model and weighting	Four Parameter Curve Fit with weighting $1/Y^2$
		Calibration Curve Precision (%CV)	1.3% to 3.0%
		Calibration Curve Accuracy (%Bias)	-6.8% to 4.8%
		Within-Run Precision (%CV)	1.7% to 10.5%
		Between-Run Precision (%CV)	6.3% to 11.2%
		Within-Run Accuracy (%Bias)	-14.5% to 4.9%
		Within-Run Accuracy (%TE)	5.0% to 25.0%
		Between-Run Accuracy (%Bias)	-11.4% to 15.2%
		Between-Run Accuracy (%TE)	7.2% to 26.4%
		Stability	Room temperature matrix stability: Not Tested Freeze-thaw matrix stability: Not Tested Matrix Storage stability: Not Tested
		Selectivity and Matrix Effect	10 matrix lots- Un spiked urine: all samples were found BLOQ

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
			Spike urine samples: 8 out of 10 individuals were within acceptable %AR.
		Metabolite cross-reactivity and Interference	ISIS 630178, ISIS 630180 and ISIS 630182 did not demonstrate meaningful cross-reactivity nor did the metabolites interfere with the specificity of the assay in the quantitation of ISIS 505358
		Prozone/Hook Effect	Analyzed 20,000 ng/mL undiluted and with at least 6 dilutions at 1:2 (10,000 ng/mL) 1:4 (5,000 ng/mL) 1:8 (2,500 ng/mL) 1:40 (500 ng/mL) 1:80 (250 ng/mL) 1:1,000 (20.0 ng/mL) 1:2,000 (10.0 ng/mL) No hook effect observed
		Dilution Linearity	Evaluated by diluting a sample containing 20,000 ng/mL ISIS 505358 at 3 different levels of concentrations (1:250, 1:1,000, 1:5,000). Dilution linearity up to 5,000 was demonstrated.
		Parallelism	NA

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
2022N497569_00 (PEGASYS In serum)	209348 (B-Together)	ICSH 21-135 (Labcorp Shanghai site) – Full Validation A Ligand Binding Assay to quantify PEGASYS in Human Serum Using ECL Technology on the MSD platform was validated. In this method, MMHA-17 is first coated onto the MSD GOLD 96-well plate as the capture reagent. After blocking the plate, 10 µL samples are loaded and incubated for a specified period. A mixture of SA Sulfo-Tag and biotin anti-PEG is then added to the plate to detect the PEGASYS in the samples. The bridge formation between conjugates is detected only if the anti-PEGASYS antibodies to PEGASYS are present and near the electrode surface. The plate is read using an MSD plate reader.	
		LLQ	1.0 ng/mL
		Validated Range	1.0 to 100 ng/mL
		Regression model and weighting	$1/Y^2$ weighted 4 Parametric (Marquardt)
		Calibration Curve Precision (%CV)	2.3% to 6.1%
		Calibration Curve Accuracy (%Bias)	-3.1% to 2.0%
		Calibration Curve Accuracy (%TE)	3.0% to 7.1%
		Within-Run Precision (%CV)	1.5% to 10.8%
		Between-Run Precision (%CV)	5.1% to 9.4%
		Within-Run Accuracy (%Bias)	-11.1% to 12.5%
		Within-Run Accuracy (%TE)	1.6% to 21.9%
		Between-Run Accuracy (%Bias)	-2.6% to 1.2%
		Between-Run Accuracy (%TE)	6.3% to 10.4%
		Stability	Room temperature matrix stability: 21 hours 59 minutes at room temperature Refrigerator stability: 75 hours 33 minutes Freeze-thaw matrix stability: 6 cycles from -10°C to -30°C and -60°C to -80°C Matrix Frozen stability: 88 days at -10°C to -30°C and -60°C to -80°C with and without bepirovirsen
		Selectivity and Matrix Effect	10 matrix lots. No matrix effect was observed in normal serum
		Interference and Specificity	No interference was observed in pooled blank

Validation Report Number (Analyte and Human Matrix)	Clinical Study Number	Summary of Method and Validation Parameters	
			serum spiked with bepirovirsen containing PEGASYS 3.0 ng/mL (LQC) and 75.0 ng/mL (HQC)
		Hemolysis Effect	Matrix effect was observed in 2% hemolyzed serum, but not observed in 1% hemolyzed serum.
		Lipemic Effect	No matrix effect was observed in Mid-level Lipemic serum
		Minimum Required Dilution (MRD)	1 in 10
		Dilution Linearity	1 in 9000 dilutions (MRD is excluded)
		Hook Effect	No Hook Effect up to 18000 ng/mL
2023N532632_01 (PEGASYS in serum)	209348 (B-Together)	ICSH 21-135 (Labcorp Shanghai site) – Addendum 1 Ligand Binding Assay to quantify PEGASYS in Human Serum Using ECL Technology on the MSD platform. In this method, MMHA-17 is first coated onto the MSD GOLD 96-well plate as the capture reagent. After blocking the plate, 10 µL samples are loaded and incubated for a specified period. A mixture of SA Sulfo-Tag and biotin anti-PEG is then added to the plate to detect the PEGASYS in the samples. The bridge formation between conjugates is detected only if the anti-PEGASYS antibodies to PEGASYS are present and near the electrode surface. The plate is read using an MSD plate reader.	
		LLQ	1.0 ng/mL
		Validated Range	1.0 to 100 ng/mL
		Stability	Matrix Frozen stability: 547 days at -60°C to -80°C and 88 days at -10°C to -30°C without bepirovirsen 546 days at -60°C to -80°C and 93 days at -10°C to -30°C with bepirovirsen

Bioanalytical method validation reports are provided in m5.3.1.4.

表 9 Between-run Accuracy and Precision of Quality Control (QC) Samples and Calibration Standards and Incurred Sample Reanalysis (ISR) Results on Clinical Studies

	Analyte	Standard Curve Performance			QC Performance	Method Reproducibility	Stability		
Clinical Study No. (Human Matrix) (Bioanalytical Report No.)		Number of calibrators	Average overall precision (≤%CV)	Accuracy (%bias range)	Total number of QC samples (n)	Average overall precision (≤%CV)	Accuracy (%bias range)	ISR passing rate (Number of ISR Samples) [% of total study samples]	Duration of storage/ Samples analyzed within known stability period
213725 (Plasma) (FTIH study) (2019N419385_00)	Bepirovirsen (ISIS 505358)	8	5.5	-5.1 to 5.0	46 (45)[a]	7.0	-6.4 to 6.2	84.4% (64) [10.3%]	<343 days
213725 (Urine) (FTIH study) (2019N419629_00)	Bepirovirsen (ISIS 505358)	7	4.7	-4.0 to 4.4	10	9.4	-9.3 to 1.8	NA (need ISR info)	Stability Not Tested (Maximum time from collection to analysis is 379 days)
205695 (ISIS 505358-CS3) (Plasma) (2020N429086_00)	Bepirovirsen	9	8.1	-3.2 to 4.8	38 (37) [a]	13.6	-2.7 to 3.0	88.4% (95) [10.9%]	<653 days
205695 (ISIS 505358-CS3) (Plasma) (2020N429086_00)	Entecavir	8	5.8	-1.4 to 1.7	10	3.0	0.0 to 1.1	100% (25) [14.0%]	<764 days
205695 (ISIS 505358-CS3) (Plasma) (2020N429086_00)	Tenofovir	8	9.2	-0.6 to 3.0	10	6.2	-1.3 to 2.4	91.7% (24) [17.2%]	<786 days

Clinical Study No. (Human Matrix) (Bioanalytical Report No.)	Analyte	Standard Curve Performance			QC Performance	Method Reproducibility	Stability		
		Number of calibrators	Average overall precision (≤%CV)	Accuracy (%bias range)	Total number of QC samples (n)	Average overall precision (≤%CV)	Accuracy (%bias range)	ISR passing rate (Number of ISR Samples) [% of total study samples]	Duration of storage/ Samples analyzed within known stability period
209668 (B-Clear) (Plasma) (2020N459216_00)	Bepirovirsen	9	7.5	-3.0 to 4.0	236 (235)[a]	9.5	-6.0 to -0.3	92.2% (637) [5.5%]	<653 days <503 days in the presence of Entecavir and Tenofovir
209668 B-Clear (Plasma) (2020N459216_00)	Entecavir	8	10.1	-2.1 to 4.4	6	6.6	-1.7 to 0.8	100% (27) [13.2%]	<764 days <496 days in the presence of Bepirovirsen and Tenofovir
209668 (B-Clear) (Plasma) (2020N459216_00)	Tenofovir	8	9.4	-1.6 to 3.0	4	6.5	-2.4 to 2.0	100% (30) [21.1%]	<786 days <502 days in the presence of Bepirovirsen and Entecavir
205871 (B-Assured) (Plasma) (2022N501415_00)	Bepirovirsen	9	6.4	-5.4 to 4.0	16	9.3	-4.7 to 1.5	83.3% (42) [11.0%]	<653 days
209348 (B-Together) (Plasma) (2022N512124_01)	Bepirovirsen	9	7.0	-1.0 to 2.5	30 (29)[a]	4.3	-1.3 to 1.5	96.7% (116) [9.4%]	<653 days [b]
209348 (B-Together) (Serum) (2023N531407_00)	PEGASYS	8	6.4	-4.6 to 7.1	80	9.0	-4.6 to 0.3	98.2% (110) [10.6%]	<547 days <546 days in the presence of bepirovirsen

Clinical Study No. (Human Matrix) (Bioanalytical Report No.)	Analyte	Standard Curve Performance			QC Performance	Method Reproducibility	Stability		
		Number of calibrators	Average overall precision (≤%CV)	Accuracy (%bias range)	Total number of QC samples (n)	Average overall precision (≤%CV)	Accuracy (%bias range)	ISR passing rate (Number of ISR Samples) [% of total study samples]	Duration of storage/ Samples analyzed within known stability period
212602 (B-Fine) (Plasma) (2024N549019_00)	Bepirovirsen	9	9.9	-2.0 to 2.0	10 (9)[a]	10.5	-3.3 to 1.5	89.7% (29) [13.0%]	<653 days
219239 (PFS SSD) (Plasma) (2023N545691_00)	Bepirovirsen	9	5.8	-2.5 to 3.0	80	5.7	-1.0 to 2.5	97.0% (201) [7.0%]	<653 days
202009 (B-Well 1) (Plasma) 2024N546998_00	Bepirovirsen	9	5.8	-2.0 to 2.6	140 (137, 138, 139) [a]	6.2	-2.0 to 1.3	96.1% (284) [6.3%]	<653 days
219288 (B-Well 2) (Plasma) 2024N546999_00	Bepirovirsen	9	5.7	-1.8 to 2.1	128 (125, 126, 127) [a]	5.9	-3.3 to 0.0	98.5% (263) [6.6%]	<653 days
205873 (QTc) (Plasma) 2024N560329_00	Bepirovirsen	9	6.6	-1.2 to 1.5	16 (15) [a]	6.1	0.0 to 4.7	96.4% (55) [11.1%]	<175 days

a. The number of QC samples in parentheses are those with statistical outliers excluded.
b. Two samples analyzed outside stability window per method. The results of the 2 samples were not used for PK analysis.

表 10 Anti-drug Antibody Assay Method Summary - GSK USA

Validation SOP	VQD-SOP-004737 (v5.0)		
Method	ELISA method to detect anti-bepirovirsen antibodies in human serum GSK3228836HUSE_ADA_A_VAL v1.0 (original validation) GSK3228836HUSE_ADA_A_VAL v2.0 (partial validation)		
Method Platform	ELISA		
Method Format	Sandwich Assay		
Positive Control	Purified rabbit anti-bepirovirsen polyclonal antibodies (poly PC) Mouse anti-bepirovirsen monoclonal antibodies (mAb PC)		
Minimum Required Sample Volume	Duplicate analysis: 10 µL (Screening), 20 µL (Confirmation), 20 µL (Titration) Singlicate analysis: 5 µL (Screening), 10 µL (Confirmation), 10 µL (Titration)		
Minimum Required Dilution	1/25		
Cut Point – Duplicate analysis	Screening	1.30 rOD for Normal human serum (NHS) subjects 1.42 rOD for Hepatitis B serum (Hep B) subjects	
	Confirmation	24.57% for NHS 22.27% for Hep B	with 3 µg/mL bepirovirsen
	Titration	1.77 rOD for NHS 2.18 rOD for Hep B	using NC for titration
Cut Point – Singlicate analysis	Screening	1.296 rOD for NHS 1.430 rOD for Hep B	
	Confirmation	27.63% for NHS 24.16% for Hep B	with 3 µg/mL bepirovirsen
	Titration	1.296 rOD for NHS 1.430 rOD for Hep B	using BC for titration

Precision – Duplicate analysis with Poly PC		Intra-Assay		Inter-Assay	
	Control	Screening	Confirmation	Screening	Confirmation
	HQC (2000 ng/mL)	3% to 4%	0% to 1%	11%	1%
	MQC (500 ng/mL)	3% to 4%	1% to 2%	9%	2%
	LQC (100 ng/mL)	4% to 5%	4% to 8%	7%	5%
	NC	3% to 5%	2% to 4%	18%	16%
	BC	4% to 5%	4% to 7%	14%	14%
Precision – Singlicate analysis with mAb PC	Control	Screening Inter-Assay			
	HQC (2000 ng/mL)	14.4%			
	MQC (500 ng/mL)	24.7%			
	LQC (25 ng/mL)	14.4%			
	NC	17.9%			
	BC	14.7%			
Sensitivity – Poly PC	Screening	31.25 ng/mL			
	Confirmation	100 ng/mL			
Sensitivity – mAb PC	Screening	31.25 ng/mL			
Prozone – Poly PC	None observed up to 50 µg/mL				
NHS Selectivity Individual subjects, NC, and BC spiked at 100 ng/mL Poly PC	Control	Screening		Confirmation	
	Spiked NC	15/15 met criteria (100%)		14/14 met criteria (100%)	
	Spiked BC	15/15 met criteria (100%)		14/14 met criteria (100%)	
Hep B Selectivity Individual subjects, NC, and BC spiked at 100 ng/mL Poly PC	Control	Screening		Confirmation	
	Spiked NC	14/14 met criteria (100%)		13/14 met criteria (93%)	
	Spiked BC	10/14 met criteria (71%)		10/14 met criteria (71%)	

Drug Tolerance – Poly PC Maximum bepirovirsen concentration at which PC is positive and NC is negative	Control	Screening	Confirmation
	250 ng/mL PC	100 ng/mL	100 ng/mL
	100 ng/mL (LQC)	100 ng/mL	100 ng/mL
	NC	100 ng/mL	100 ng/mL
Drug Tolerance – mAb PC Maximum bepirovirsen concentration at which PC is positive	Control	Screening	Confirmation
	250 ng/mL PC	100 ng/mL	100 ng/mL
	100 ng/mL PC	100 ng/mL	100 ng/mL
	25 ng/mL (LQC)	100 ng/mL	100 ng/mL
Matrix Interference	Hemolysis	None observed	
	Lipemia	False positive screening and confirmation result	
Specificity	The assay was confirmed to be specific for bepirovirsen and not specific for a non-relevant humanized biotherapeutic by inhibition.		
Robustness	All controls met acceptance criteria when varying plate lots, manual vs automated pipetting, incubation times at the minimum and maximum allowable limit, storage of the coating sub-stock at 5°C, storage of the coated and blocked plates at 5°C, and different NC lots		
Stability The temperatures listed are the set-points for which the cold units are set to maintain	Condition		Maximum Acceptable
	Freeze-Thaw (-70°C to Ambient)		Up to 10 Cycles
	Refrigerated (5°C)		Up to 14 Days
	Ambient		Up to 14 Days
Acceptance Ranges – Duplicate analysis with Poly PC	Control	Lot	Acceptance Range
	HQC	219795-01	13.93 to 30.10 rOD
	MQC	219795-01	5.34 to 10.17 rOD
	LQC	219795-01	2.11 to 3.10 rOD
	NC	BRH1512283	0.078 to 0.276 OD
	BC	Various	0.036 to 0.099 OD

Acceptance Ranges – Singlicate analysis with mAb PC	Control	Lot	Acceptance Range
	HQC	RR01988-HQC	17.83 to 34.21 rOD
	MQC	RR01988-MQC	5.220 to 26.86 rOD
	LQC	RR01988-LQC	1.296 to 2.959 rOD
	NC	HMN1201617	0.06748 to 0.2257 OD
	BC	Various	0.0326 to 0.1064 OD

Bioanalytical method validation reports are provided in m5.3.1.4.

表 11 Anti-drug Antibody Assay Method Summary - Labcorp Shanghai China

Method	ELISA Method for Determination of Antibodies to GSK3228836 in Human serum ICSH 24-121				
Method Platform	ELISA				
Method Format	Sandwich Assay				
Positive Control	Mouse anti-GSK3228836 monoclonal antibodies (mAb PC)				
Minimum Required Sample Volume	Singlicate analysis: 10 µL (Screening), 10 µL (Confirmation), 10 µL (Titration)				
Minimum Required Dilution	1/25				
Cut Point – Singlicate analysis	**Screening**	1.333 rOD for NHS 1.641 rOD for Hep B			
	Confirmation	26.43% for NHS 35.90% for Hep B		with 3.125 µg/mL GSK3228836	
	Titration	1.333 rOD for NHS 1.641 rOD for Hep B		using BC for titration	
Precision – Singlicate analysis with mAb PC		**Intra-Assay**		**Inter-Assay**	
	Control	**Screening**	**Confirmation**	**Screening**	**Confirmation**
	HPC (2000 ng/mL)	0.91% to 3.48%	0.31% to 1.06%	8.65%	2.65%
	MPC (500 ng/mL)	1.84% to 2.13%	0.64% to 0.93%	10.72%	2.35%
	LPC (25.0 ng/mL)	2.38% to 3.82%	1.62% to 4.05%	7.66%	14.05%

	NC	5.44% to 6.38%	3.49% to 3.90%	13.45%	14.97%
	BC	1.83% to 5.91%	2.16% to 3.99%	12.12%	9.70%
Sensitivity – mAb PC	**Screening**	15.6 ng/mL in NC			
	Confirmation	15.6 ng/mL in NC			
NHS Selectivity Normal individual subjects, unspiked, spiked at LPC (25.0 ng/mL) and 100 ng/mL mAb PC	**Control** Spiked NC	**Screening** 15/15 normal individual subjects met criteria (100%)		**Confirmation** 15/15 normal individual subjects met criteria (100%)	
Hep B Selectivity Hep B individual subjects, unspiked, spiked at LPC (25.0 ng/mL) and 100 ng/mL mAb PC	**Control** Spiked NC	**Screening** 15/15 Hep B individual subjects met criteria unspiked and spiked at 100 ng/mL mAb PC (100%)		**Confirmation** 15/15 Hep B Individual subjects met criteria in unspiked and spiked at 100 ng/mL mAb PC (100%)	
Drug Tolerance – mAb PC Maximum GSK3228836 concentration at which PC is positive and NC is negative	**Control**	**Screening**		**Confirmation**	
	250 ng/mL PC	100 ng/mL		100 ng/mL	
	100 ng/mL PC	100 ng/mL		100 ng/mL	
	25.0 ng/mL (LPC)	100 ng/mL		100 ng/mL	
	NC	100 ng/mL		100 ng/mL	
Matrix Interference	**Hemolysis**	None observed 5/5 Hemolyzed individual subjects met criteria in the screening and confirmation assay (100%)			
	Lipemia	None observed 5/5 Lipemic individual subjects met criteria in the screening and confirmation assay (100%)			
Specificity	The assay was confirmed to be specific for GSK3228836 and not specific for a non-relevant humanized biotherapeutic by inhibition.				
Robustness	All controls met acceptance criteria when varying plate lots, incubation times at the minimum and maximum allowable limit, storage of the coating sub-stock at 5°C, storage of the coated and blocked plates at 5°C, storage of the coated plates at 37°C.				
Stability	**Condition**			**Maximum Acceptable**	

The temperatures listed are the set-points for which the cold units are set to maintain	Freeze-Thaw (-70°C to Ambient)		Up to 10 Cycles
	Refrigerated (5°C)		Up to 14 days
	Ambient		Up to 14 days
Hook effect	No hook effect was observed with PC sample concentration up to 20 000 ng/mL, and the maximum dilution faction is 1:25600.		
Acceptance Ranges – Singlicate analysis with mAb PC	**Control**	**Lot**	**Acceptance Range**
	HPC	8527647VB01/8527647VB37	19.773 to 36.948 rOD
	MPC	8527647VB01/8527647VB37	8.581 to 18.606 rOD
	LPC	8527647VB01/8527647VB37	1.496 to 2.377 rOD
	NC	8527647VB01/8527647VB37	0.077 to 0.147 OD
	BC	Various	0.037 to 0.080 OD

Bioanalytical method validation reports is provided in m5.3.1.4.

表 12　Summary of Anti-Drug Antibody Assay Performance in Clinical Studies

Clinical Study No. (Bioanalytical Report No.) Location of Testing	Assay Tier (Pass Rate)	Control (units)	HQC (rOD)	LQC (rOD)	NC (OD)	BC (OD)
205871 (Bioanalytical Report No. 2022N510349_00) GSK, USA	Screen Assay (85.7%)	Mean	19.9067	2.31817	0.150917	N/A
		SD	1.62366	0.073186	0.008350	N/A
		%CV	8.15636	3.15706	5.53266	N/A
		N	6	6	6	0
	Confirmation Assay (100%)	Mean	19.9575	2.49375	0.167850	N/A
		SD	0.860286	0.224576	0.012493	N/A
		%CV	4.31059	9.00554	7.44268	N/A
		N	4	4	4	0
	Titer Assay (100%)	Mean	N/A	2.85900	0.160300	N/A
		SD	N/A	0.196576	0.019375	N/A
		%CV	N/A	6.87568	12.0865	N/A
		N	0	2	2	0
219239 (Bioanalytical Report No. 2024N554692_01) GSK, USA	Combined Screen, Confirmation and Titer Assays (84.2%) Screen and Confirmation assays performed on the same plate. Titer assay performance combined due to limited number of runs (2).	Mean	29.1528	2.00796	0.112718	0.048904
		SD	3.03486	0.216091	0.026383	0.008583
		%CV	10.4102	10.7617	23.4059	17.5502
		N	24	30	16	4
202009 (Bioanalytical Report No. 2024N558045_00) GSK, USA	Screen Assay (77.42%)	Mean	25.1668	1.81128	0.134786	N/A
		SD	4.15067	0.242157	0.029965	N/A
		%CV	16.49	13.37	22.23	N/A
		N	93	96	48	N/A
	Confirmation Assay (88.24%)	Mean	25.4261	1.83784	0.123125	N/A
		SD	3.88745	0.183478	0.019827	N/A
		%CV	15.29	9.98	16.10	N/A
		N	59	56	30	N/A

Clinical Study No. (Bioanalytical Report No.) Location of Testing	**Assay Tier (Pass Rate)**	**Control (units)**	**HQC (rOD)**	**LQC (rOD)**	**NC (OD)**	**BC (OD)**
	Titer Assay (87.67%)	Mean	N/A	2.05419	0.121763	0.064398
		SD	N/A	0.262027	0.024240	0.013130
		%CV	N/A	12.76	19.91	20.39
		N	N/A	64	64	128
219288 (Bioanalytical Report No. 2025N564553_00) GSK, USA	Screen Assay (77.27%)	Mean	27.3790	1.87554	0.114633	N/A
		SD	4.81892	0.251257	0.017234	N/A
		%CV	17.6008	13.3965	15.0337	N/A
		N	66	67	34	N/A
	Confirmation Assay (67.74%)	Mean	28.9084	1.98443	0.114984	N/A
		SD	3.52065	0.274001	0.017596	N/A
		%CV	12.1786	13.8076	15.3032	N/A
		N	40	40	21	N/A
	Titer Assay (91.67%)	Mean	N/A	2.02916	0.121875	0.064714
		SD	N/A	0.221787	0.020969	0.016798
		%CV	N/A	10.9300	17.2056	25.9574
		N	N/A	55	55	110
202009 (Bioanalytical Report No. 2025N566605_00) Labcorp, Shanghai, China	Screen Assay (92.3%)	Mean	23.567	1.777	0.121	NA
		SD	2.025	0.124	0.015	NA
		%CV	8.59	6.98	12.61	NA
		N	23	22	12	NA
	Confirmation Assay (66.7%)	Mean	26.240	1.803	0.113	NA
		SD	3.149	0.183	0.013	NA
		%CV	12.00	10.16	11.17	NA
		N	11	12	6	NA
	Titer Assay (78.9%)	Mean	24.713	1.816	0.127	0.056
		SD	3.189	0.192	0.014	0.004
		%CV	12.90	10.55	11.35	7.24
		N	27	27	15	30

Clinical Study No. (Bioanalytical Report No.) Location of Testing	**Assay Tier (Pass Rate)**	**Control (units)**	**HQC (rOD)**	**LQC (rOD)**	**NC (OD)**	**BC (OD)**
219288 (Bioanalytical Report No. 2025N566606_00) Labcorp, Shanghai, China	Screen Assay (75.0%)	Mean	25.602	1.915	0.113	NA
		SD	3.314	0.136	0.012	NA
		%CV	12.94	7.09	10.96	NA
		N	23	22	12	NA
	Confirmation Assay (100.0%)	Mean	29.188	1.981	0.101	NA
		SD	2.326	0.156	0.007	NA
		%CV	7.97	7.86	7.44	NA
		N	12	11	6	NA
	Titer Assay (95.2%)	Mean	26.058	1.882	0.113	0.058
		SD	3.298	0.162	0.013	0.005
		%CV	12.66	8.62	11.12	9.07
		N	38	36	20	40

NA: Not applicable

表 13 Summary Results of All Biopharmaceutic Studies

Protocol Number	Study Objective(s)	Study Design	Number of Participants (M/F) Age Mean (Range) Participant type	Treatment Details (Drug/Dose/ Form/Route/ Frequency)	Geometric Mean Parameters (95% CI)		Study Report Location
					Cmax (ng/mL)	AUC (0-inf) (h*ng/mL)	
219239 Relative bioavailability study	To estimate the relative bioavailability of vial and PFS SSD for a single dose of bepirovirsen delivered by SC injection by an HCP in healthy participants	Phase 1, randomized, open-label, parallel group, single dose study	Participants (n[%]): 160 (100) • Group 1: 46 • Group 2: 49 • Group 3: 32 • Group 4: 33 Gender (%) (F/M): 82/77 Age (median [range]): 35 years (18 to 56).	Bepirovirsen Solution for Injection, 150 mg/mL packaged in a vial/ 2 injections required to deliver 300 mg dose/SC administered by HCP	9873.38 (8783.55, 11098.43)	111843.70 (101678.77, 123024.83)	m5.3.1.2
				Bepirovirsen Solution for Injection, 150 mg/mL packaged in a PFS SSD/ 2 injections required to deliver 300 mg dose/SC administered by HCP	10242.48 (9180.43, 11427.40)	119271.61 (109714.91, 129660.74)	
				Bepirovirsen Solution for Injection, 150 mg/mL packaged in a PFS SSD/ 2 injections required to deliver 300 mg dose/SC administered by Self Post-Training	10391.83 (8893.76, 12142.24)	119080.46 (107933.67, 131378.42)	
				Bepirovirsen Solution for Injection, 150 mg/mL packaged in a PFS SSD/ 2 injections required to deliver 300 mg dose/SC administered by Self Without Training	9516.35 (8018.31, 11294.27)	112338.58 (98707.91, 127851.53)	

2.7.2 臨床薬理試験

目次

略号等一覧 4
1. 背景及び概観 7
1.1. ベピロビルセンの主な臨床薬理学的特性 7
2. 個々の試験結果の要約 12
2.1. 非臨床試験成績 12
2.2. 臨床薬物動態 14
2.2.1. 健康被験者の PK 14
2.2.2. 対象疾患の患者集団の PK 16
2.2.3. 特別な患者集団の PK 21
2.2.4. DDI 試験 22
2.3. 臨床薬力学 22
2.4. 濃度-反応関係 22
2.4.1. 非臨床試験 22
2.4.2. QTcF への影響を評価する試験 23
3. 全試験を通しての結果の比較と解析 24
3.1. 臨床薬理 24
3.1.1. 概観（ADME） 24
3.1.2. PopPK 解析 24
3.2. DDI 25
3.2.1. 被相互作用薬としての DDI 25
3.2.2. 相互作用薬としての DDI 26
3.3. 内因性要因 28
3.3.1. 年齢 28
3.3.2. 体重 29
3.3.3. ADA の影響 30
3.3.4. 人種及び民族 31
3.3.5. 性別 35
3.3.6. 腎機能障害 35
3.3.7. 肝機能障害 35
3.4. 外因性要因 36
3.4.1. 注射部位 36

3.5. 臨床薬力学 36
3.5.1. 治療効果に関連する特性 36
3.6. 用量又は濃度-反応関係 37
3.6.1. PopPK-HBs 抗原解析 37
3.6.2. PopPK-HBs 抗原-ALT 解析 43
3.6.3. PopPK-血小板解析 47
3.6.4. QTc への影響 48
3.7. 用量調整 48
4.A 特別な試験 49
4.1.A 免疫原性 49
4.1.1.A 219239 試験（相対的バイオアベイラビリティ試験） 49
4.1.2.A B-Assured 試験 50
4.1.3.A B-Well 1 試験 50
4.1.4.A B-Well 2 試験 51
4.1.5.A 第 3 相 PopPK 解析及び PopPK-PD 解析による ADA の影響の評価 52
参考文献一覧 A 52
5.A 付録 55

略号等一覧

略号（略称）	英語	日本語
2’-MOE	2’-*O*-methoxy ethyl	2’-*O*-メトキシエチル
ABC	ATP-binding cassette	ATP 結合カセット
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADME	absorption, distribution, metabolism and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
ALAG	absorption lag time	吸収のラグタイム
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ASO	antisense oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC(0-x)	area under the concentration-time curve from time 0 to x hours	0 時間から投与後 x 時間までの AUC
AUC(0-inf)	area under the concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinite time	0 時間から無限大時間までの AUC
AUC(0-tau), AUC(0-τ)	area under the concentration-time curve over a dosing interval	投与間隔の AUC
BCRP	breast cancer resistance protein	乳がん耐性蛋白質
BMI	body mass index	ボディマス指数
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
CI	confidential interval	信頼区間
CL/F	apparent clearance	見かけのクリアランス
Cmax	maximum drug concentration	最高血漿中濃度
CRCL	creatinine clearance	クレアチニンクリアランス
CSR	clinical study report	総括報告書
Ctrough	pre-dose (trough) concentration at the end of the dosing interval	血漿中トラフ濃度（反復投与時の投与直前の濃度）
CV	coefficient of variation	変動係数
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
DDI	drug-drug interaction	薬物相互作用
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ΔQTcF	change in QTcF from baseline	QTcF のベースラインからの変化量
ΔΔQTcF	placebo-corrected change from baseline in QTcF	QTcF のベースラインからの変化量のプラセボとの差
EC50	half maximal effective concentration	最大作用の 50%に達する濃度
ECG	electrocardiogram	心電図
eGFR	estimated glomerular filtration rate	推算糸球体濾過量
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
FC	functional cure	機能的治癒
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FTIH	first time in human	－
Geo Mean	geometric mean	幾何平均
HBs	hepatitis B surface	B 型肝炎ウイルス表面
HBV	hepatitis B virus	B 型肝炎ウイルス
hERG	human ether-a-go-go-related gene	－

略号（略称）	英語	日本語
IC50	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
Imax	maximum drug inhibition	最大薬物阻害率
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
LOD	limit of detection	検出限界
MATE	multidrug and toxin extrusion transporter	多剤毒素排出トランスポーター
MHRD	maximum human recommended dose	最大ヒト推奨用量
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MRP	multidrug resistance-associated protein	多剤耐性関連蛋白質
NA	nucleos(t)ide analogue	核酸アナログ
NCA	non-compartmental analysis	ノンコンパートメント解析
NZW	New Zealand white	ニュージーランドホワイト
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
pcVPC	prediction-corrected visual predictive check	―
PD	pharmacodynamic	薬力学
PegIFN	pegylated interferon	ペグインターフェロン
PK	pharmacokinetic	薬物動態
PopPK	population pharmacokinetics	母集団薬物動態
Q3/F	apparent intercompartmental clearance between central and shallow peripheral compartments following extravascular administration	血管外投与後の中央コンパートメントと浅い末梢コンパートメント間の見かけのコンパートメント間クリアランス
Q4/F	apparent intercompartmental clearance between central and deep	見かけの中央コンパートメントと深部コンパートメント間クリアランス
QTc	QT Interval corrected	補正 QT 間隔
QTcF	QT Interval corrected for heart rate according to Fridericia’s formula	Fridericia 式により補正した QT 間隔
QTcI	individual-specific QT correction	個別に補正した QT 間隔
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RNase H	ribonuclease H	リボヌクレアーゼ H
RV (σ2)	residual variability (RV estimated as variance)	残差変動（分散として推定した RV）
SAG2	new HBsAg level after end of treatment	投与終了後の HBs 抗原量
SCr	serum creatinine	血清クレアチニン
SD	standard deviation	標準偏差
SE	standard error(s)	標準誤差
SLC	solute carrier	溶質輸送体
t1/2	terminal elimination half-life period	終末相の消失半減期
tmax	time of maximum concentration	最高血漿中濃度到達時間
UGT	uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase	ウリジン 5’-二リン酸グルクロン酸転移酵素

2.7.2. 臨床薬理試験

略号（略称）	英語	日本語
V2/F	apparent volume of distribution from the central compartment	中心コンパートメントの見かけの分布容積
V3/F	apparent volume of distribution of the shallow peripheral compartment	末梢コンパートメントの見かけの分布容積

1. 背景及び概観

本剤であるベピロビルセンナトリウム（以下、ベピロビルセン、GSK3228836 又は ISIS 505358 と略す）はすべての HBV mRNA 及びプレゲノム RNA を標的とするキメラ型 2’-MOE 修飾ホスホロチオエート ASO であり、RNase H を介した mRNA の分解により、HBV DNA 及び HBs 抗原等のウイルス蛋白量を低下させる。HBs 抗原等の HBV ウイルス抗原は免疫抑制機能を有し、HBV に特異的な獲得免疫の免疫不応答及び T 細胞疲弊を促進する[Thimme, 2024]。

本 m2.7.2 では、ベースラインの HBs 抗原量≤3000 IU/mL の NA 治療による基礎治療を受けている HBV 持続感染患者へベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）したときのベピロビルセンの臨床薬理（PopPK 解析並びに有効性及び安全性評価項目の PopPK-PD 解析を含む）について要約する。なお、特に記載のない限り、臨床試験ではベピロビルセンナトリウムとして投与した。投与量及び分析対象物質の濃度は親化合物のベピロビルセンを示す。

免疫原性の結果については Section 4.1.A に要約を示し、詳細を m5.3.5.3（免疫原性に関する統合概要）に示す。臨床及び非臨床ウイルス学的評価（ベピロビルセンの作用機序の詳細を含む）並びに臨床バイオマーカー試験については m2.7.2.4（特別な試験）に示す。臨床薬理試験で得られた安全性データについては m2.7.4（臨床的安全性の概要）に示す。すべての臨床試験の一覧を m5.2 に示す。

本 m2.7.2 に示すベピロビルセンの PK、PD 及び PK-PD 関係は、表 12 に示す臨床薬理を評価した試験及び表 13 に示す解析に基づき評価したものである。

1.1. ベピロビルセンの主な臨床薬理学的特性

ベピロビルセンの主な PK 及び PK-PD 特性を以下に要約する。

PK（Section 3.1）：

- ベピロビルセンは皮下投与後に速やかに吸収された。血漿中ベピロビルセンの tmax の中央値は 3 時間であり、その後、速やかな分布相及びそれに続く緩徐な終末消失相からなる多相的な血漿中濃度の低下が認められた。この特性は、他の ASO の PK 特性と一致していた。
- 最終 PopPK モデルで、体重及び ADA の有無は統計学的に有意な共変量であった。しかし、[redacted]、又は [redacted]によりベピロビルセンの PK-PD をシミュレーションした結果、[redacted]。
- 最終 PopPK モデルにおいて、人種（アジア人、非アジア人）を含むその他の共変量は、ベピロビルセンの PK に対する統計学的に有意な共変量として特定されなかった。また、異なる人種・民族群（臨床的に注目すべき共変量）でベピロビルセンの曝露量をシミュレーションしたところ、臨床的に意味のある差は認められなかった。
- ベピロビルセンの PK 特性の要約を表 1 に示す。

PopPK-HBs 抗原-ALT 解析（Section 3.6）：

- ベピロビルセンでは、全 HBV genotype 群で標準治療に比べて Week 72 で高い治療反応を示すことが示唆された。PopPK-PD 解析において、[redacted]。
- これらの共変量の全体的な影響に基づき、いずれの部分集団でも用量調整が不要であることが示された。
- 曝露量依存的な ALT 増加は認められなかった。本モデルに基づくシミュレーションから、ALT の増加は主に HBs 抗原量の低下に起因し、ベピロビルセンの直接的な肝毒性によるものではないことが示唆された。
- 本モデルから、ベースラインの HBs 抗原量≤3000 IU/mL の NA 治療を受けている HBV 持続感染患者に対するベピロビルセンの用法・用量（案）として、通常、成人にはベピロビルセンとして 1 回 300 mg を投与 1 週目及び 2 週目は 3～4 日毎に週 2 回、投与 3 週目以降は 24 週目まで週 1 回、皮下注射することが支持された。

PopPK-血小板解析（Section 3.6.3）：

- 血小板数は、ベピロビルセン投与後に経時的に減少し、ベピロビルセン投与中止後にベースライン値付近にまで回復した。
- 血小板数の経時推移の特性を評価するため、PK-血小板モデルを開発した。[redacted]。
- 本モデルから、ベピロビルセンを用法・用量（案）で投与したときの血小板数に関する安全性が支持された。ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）終了時の Grade 1～4 の血小板減少症の発現割合は、それぞれ[redacted]%、[redacted]%、[redacted]%及び[redacted]%と予測された。[redacted]。

QTcF への影響（Section 3.6.4）：

- ベピロビルセン 450 mg 及び 600 mg 単回投与後、血漿中ベピロビルセン濃度と ΔΔQTcF に関連性は認められなかった。

DDI（Section 3.2）：

- ベピロビルセンの DDI の可能性を、in vitro データ及び臨床データを用いて探索した結果、臨床的に重要な DDI の発現は予測されなかった。

用量調整及び特別な集団（Section 3.3 及び Section 3.4）：

- PopPK 及び PopPK-PD 解析から、患者の年齢、性別、体重、人種及び民族集団（中国人及び日本人等）、注射部位、ADA の有無、ベースラインの HBs 抗原量又は HBV genotype に基づく用量調整が不要であることが示された。
- ベピロビルセンを NA、又は主な CYP 酵素及び薬物トランスポーターの基質、誘導薬若しくは阻害薬である他の薬物と併用する場合、用量調整は不要である。
- 軽度腎機能障害者での用量調整は不要である。中等度（3 例）又は重度（0 例）腎機能低下者のデータは限られている。
- ベピロビルセンは、肝硬変（Child-Pugh 分類 A、B 又は C）を有する HBV 持続感染患者には禁忌である。
- 18 歳未満の患者に対するベピロビルセンの安全性及び有効性は評価されていない。

免疫原性（Section 3.3.3 及び Section 4.1.A）：

- ベピロビルセン投与後に ADA が認められた被験者は B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験でそれぞれ 267/642 例（42%）及び 250/561 例（45%）であった。
- ADA は PopPK モデルの CL/F に対して統計学的に有意な共変量であったが、[redacted]。
- ADA の有無に基づく曝露量の違いによる影響を PopPK-HBs 抗原解析及び PopPK-血小板解析により評価した結果、ベピロビルセンの有効性又は安全性プロファイルに臨床的に意味のある変化は示されなかった。

表 1　ベピロビルセンの PK 特性の要約

パラメータ／特性		ベピロビルセンの PK 特性
全般的な PK 特性	ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間皮下投与した時の曝露量（平均値）	Cmax,ss: 9.14 µg/mL AUC(0-tau),ss: 102 h*µg/mL Ctrough,ss: 0.0222 µg/mL （m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report [TMF-22893862]）
	HBV 持続感染患者と健康被験者の PK の比較	PopPK 解析において HBV 持続感染は有意な共変量として特定されなかった（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report）。
	用量比例性	ベピロビルセンを反復投与した時、ベピロビルセンの Cmax 及び AUC(0-tau)は用量 150～300 mg の範囲で用量比例的に増加した。Day 22 の Cmax 及び AUC(0-tau)と用量との関係を評価した結果、傾きの推定値（90% CI）は、Cmax で 1.216（0.743, 1.689）、AUC(0-tau)で 1.296（0.996, 1.596）であった（m5.3.4.2, 205695 試験 CSR）。
	蓄積	Cmax 及び AUC(0-24)の幾何平均値の、6 回反復投与後の初回投与後に対する比率はそれぞれ 0.91 及び 0.89 であった（m5.3.4.2, 205695 試験 CSR）。Cmax 及び AUC の値から、負荷投与後に血漿中ベピロビルセンの蓄積が認められないことが示唆された。

パラメータ／特性		ベピロビルセンの PK 特性
	時間依存性	時間依存的な PK は認められなかった。ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間投与した時の各来院時点の Ctrough の平均値は、0.020～0.032 μg/mL の範囲であった（m5.3.5.1, B-Clear 試験 CSR）。
	定常状態到達時間	ベピロビルセン 300 mg の週 1 回投与に加え、Day 4 及び 11 に負荷投与を実施した時、血漿中ベピロビルセン濃度は Day 8 までに定常状態に達した（m5.3.5.1, B-Clear 試験 CSR Figure 104.4; m5.3.5.2, B-Fine 試験 CSR Figure 4.3）。
吸収	絶対的バイオアベイラビリティ	ベピロビルセンの絶対的バイオアベイラビリティは評価されていない。
	tmax（中央値、範囲）	3 時間（2～5 時間）［B-Clear 試験の On-NA コホート第 1 治療群（300 mg を週 1 回 24 週間皮下投与）の NCA］
	食事の影響	皮下投与されるため、該当しない。
分布	見かけの分布容積	70.9 L (m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report)
	血漿蛋白結合率	ヒトでの血漿蛋白結合率は≥95%であった（m2.6.4, Section 3.2.1）。
	組織分布	マウス及びカニクイザルを用いて肝臓及び腎臓中ベピロビルセン濃度を定量した試験から、ベピロビルセンは他の ASO と同様に広範な組織分布を示すことが確認された（m2.6.4, Section 3.3）。
代謝	代謝経路	非臨床試験から、ベピロビルセンの代謝経路は、同じ構造を有する他の ASO の代謝プロファイルと一致することが示された [Geary, 2015]（m2.6.4, Section 4.2）。
排泄	排泄経路	他の ASO を対象とした試験、並びにカニクイザルを用いて肝臓及び腎皮質組織でのベピロビルセン代謝物を定量した試験から、ベピロビルセンは組織内で代謝され、短鎖オリゴヌクレオチドとなって腎臓から排泄されると考えられる[Geary, 2015]（m2.6.4, Section 5）。投与後 24 時間以内のベピロビルセン未変化体の尿中排泄率は、投与量の 2%未満であった（m5.3.3.1, 213725 試験 CSR）。
	血漿中 t1/2（中央値）	29 日（m5.3.5.1, B-Clear 試験 CSR）
	総クリアランス（CL/F）	CL/F の代表値は 2.99 L/hr である（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report）。
DDI	被相互作用薬 (Section 3.2.1)	• ベピロビルセンを含む ASO は、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼにより代謝され、通常は CYP 酵素により代謝されることはない。したがって、ベピロビルセンの動態は、CYP 酵素もしくは薬物トランスポーターの阻害薬又は誘導薬による影響を受けないと予測される（m2.6.4, Section 4.1, 6.1）。 • PopPK モデルで、第 3 相試験で併用した NA 治療を共変量として評価した結果、ベピロビルセンの PK に影響を及ぼさないことが示された。 • 代謝経路、in vitro 試験及び PopPK 解析から、他の併用薬が臨床的に重要な DDI を有し、ベピロビルセンの曝露量に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

パラメータ／特性		ベピロビルセンの PK 特性
	相互作用薬 (Section 3.2.2)	• ベピロビルセンは、主要な CYP 酵素及び UGT の臨床的に重要な誘導薬、又は可逆的及び時間依存的阻害薬ではない。 • In vitro では、ベピロビルセンは CYP3A4 の弱い誘導薬かつ CYP2C8 の阻害薬であるが、Basic 法及びメカニズムに基づく静的モデルから、臨床的に重要な DDI リスクを有しないと予測された（m2.6.4, Section 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4）。 • ベピロビルセンによる、主要な薬物トランスポーターの阻害は認められなかった。In vitro では、ベピロビルセンは MRP2 を阻害したが、Basic 法及びメカニズムに基づく静的モデルによるシミュレーションの結果、ベピロビルセンは臨床的に重要な MRP2 の阻害薬ではないと予測された（m2.6.4, Section 3.2.4, 6.2）。 • ベピロビルセンと NA 治療の併用投与は NA の曝露量に変化を及ぼさなかった。
内因性要因	年齢 (Section 3.3.1)	• PopPK 及び PopPK-PD 解析の結果、年齢は臨床的に意味のある共変量ではなかったため、年齢に基づく用量調整は不要である。 • 18 歳未満の患者に対するベピロビルセンの安全性及び有効性は評価されていない。
	体重 (Section 3.3.2)	• 体重は、CL/F 及び V2/F に対する有意な共変量であった。 • PopPK-PD 解析の結果、体重に応じたベピロビルセンの曝露量の変動は、臨床的に意味があるものではないと考えられる。 • 患者の体重に基づく用量調整は不要である。
	人種／民族 (Section 3.3.4)	• PopPK 解析の結果、人種及び民族は、ベピロビルセンの曝露量に統計学的に有意な影響を及ぼす共変量ではなかった。 • いずれの人種又は民族の部分集団に対しても用量調整は不要である。
	性別 (Section 3.3.5)	• 性別はベピロビルセンの PK に影響を及ぼさず、性別に基づく用量調整は不要である。
	腎機能障害 (Section 3.3.6)	• PopPK 解析で、軽度腎機能低下（eGFR が 60～90 未満 mL/min/1.73 m^2）がベピロビルセンの PK に及ぼす影響を評価した。 • PopPK 解析に含めた軽度腎機能低下者は 2003 例中 388 例（19.4%）であった。PopPK 解析の結果、軽度腎機能低下は共変量として特定されなかった。したがって、軽度腎機能障害を有する HBV 持続感染患者での用量調整は不要である。 • 中等度又は重度腎機能低下者（eGFR が 15～60 未満 mL/min/1.73 m^2）のデータは限られている。
	肝機能障害 (Section 3.3.7)	• HBV 持続感染を有さない中等度肝機能低下者の血漿中ベピロビルセンの Cmax 及び AUC は、肝機能正常者と比較して約 30%小さかった。 • 肝硬変（Child-Pugh 分類 A、B 又は C）を有する HBV 持続感染患者へのベピロビルセンの投与を評価した試験はな

パラメータ／特性		ベピロビルセンの PK 特性
		く、これらの患者集団へのベピロビルセンの投与は禁忌である。
	免疫原性 (Section 3.3.3, 4.1.A)	• PopPK 解析において、ADA の有無は CL/F に対する統計学的に有意な共変量であった。 • [redacted]。ベピロビルセン投与後の ADA の発現は、ベピロビルセンの有効性又は安全性プロファイルに影響を与えなかった。
外因性要因	注射部位 (Section 3.4.1)	• ベピロビルセン皮下投与の注射部位を腹部、大腿部又は上腕部とすることが支持された。 • 注射部位の影響は、ベピロビルセンの PK に影響を及ぼす共変量ではなかった。

2. 個々の試験結果の要約

2.1. 非臨床試験成績

血漿蛋白結合

ベピロビルセンは高い血漿蛋白結合率を示す。ベピロビルセンの血漿蛋白への結合は親水性相互作用によるもので、親和性が低く、非特異的である。臨床及び毒性試験に相当する濃度でのベピロビルセンの蛋白結合率を m2.6.4, Section 3.2.1 に示す。蛋白結合率が高いことによって、糸球体濾過が妨げられ、尿中排泄が制限されると考えられる（m2.6.4, Section 5）。

In Vitro 代謝及びトランスポーター

薬物代謝酵素：ベピロビルセンは CYP 酵素の基質ではなく、主にエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによって分解される。また、ベピロビルセンが CYP 酵素又は薬物トランスポーターを介した DDI の被相互作用薬又は相互作用薬である可能性は低い。ベピロビルセンの DDI リスクを in vitro で評価した。また、ベピロビルセン 1.14 μM（臨床用量 300 mg の皮下投与後の Cmax に相当）が相互作用薬として CYP 酵素及びトランスポーターに作用する可能性を、FDA のガイドライン及び ICH M12 ガイドラインに従い、Basic 法及びメカニズムに基づく静的モデルで評価した[FDA, 2022; ICH, 2024]。In vitro では、ベピロビルセンは CYP3A4 の弱い誘導薬かつ CYP2C8 の阻害薬であるが、Basic 法による静的モデルに基づくと、臨床的に重要な DDI リスクを有するとは予測されなかった。In vitro 試験では、ベピロビルセンによる CYP1A2 又は CYP2B6 の誘導は認められなかった。ベピロビルセンは、主要な CYP 酵素の臨床的に重要な誘導薬ではなく、可逆的及び時間依存的な阻害薬でもなかった。ベピロビルセンは UGT 酵素の可逆的阻害薬ではなかった（m2.6.4, Section 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4）。

トランスポーター：ベピロビルセンは取込み又は排出トランスポーターの基質ではない。ベピロビルセンが BCRP、P-gP 及び MRP2（ABC トランスポーター）並びに MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2（SLC トランスポーター）の基質である可能性を in vitro で評価した結果、ベピロビルセンはこれらのトランスポ

ーターの基質ではないと結論付けられた（m2.6.4, Section 3.2.3）。ベピロビルセンは in vitro で主要な薬物トランスポーター（MRP2 を除く）を阻害しなかった。Basic 法による静的モデルに基づき、ベピロビルセンは臨床的に重要な MRP2 の阻害薬ではないと予測された（m2.6.4, Section 3.2.4）。モデルに基づく更なる解析、及び DDI の全体的な結論についての考察を Section 3.2 に示す。

ADME

非臨床 PK データの概要を m2.4（非臨床試験の概括評価）の Section 3 及び Section 5.2 に示す。

マウスにベピロビルセンを皮下投与した時、tmax は雌雄ともにおおむね 0.5 時間であった。全身曝露量（AUC）は用量依存的に増加し、性差は認められなかった。カニクイザルでは、Cmax はおおむね用量比を下回って増加したが、AUC(0-48)は単回投与後には用量に比例して増加し、反復投与後には用量比を上回って増加した。

サルでは、腎臓及び肝臓中濃度は全用量範囲で用量比を下回って増加した。最長 26 週間の試験において、13 週間の休薬期間後、ベピロビルセンはマウスの高用量群の肝臓並びにサルの肝臓及び腎臓で検出された。肝臓中濃度は雌雄マウスで同程度であり、概して用量に比例して増加した。一方、腎臓中濃度は用量比を下回って増加し、雌マウスの腎臓中曝露量はすべての用量で雄マウスよりも有意に高かった。サル 39 週間試験では、26 週間の休薬期間終了時に採取した肝臓及び腎臓試料中のベピロビルセン濃度はすべて<LLOQ であった。

妊娠 CD-1 マウスの胎児肝臓及び妊娠 NZW ウサギの胚又は胎児肝臓ではベピロビルセンは定量できなかったことから、ベピロビルセンは胚又は胎児に容易に移行しないことが示された。乳汁中及び出生児の肝臓中の曝露量はわずか（母動物の肝臓中濃度の 1.0%未満）であったことから、乳汁を介した移行は低いことが示された。

第 1 相及び第 2 相試験で得られたヒト血漿を用いたベピロビルセンの代謝プロファイルは検討しなかったが、第 3 相 B-Well 1 試験から採取した血漿検体プールを用いて定性的解析を実施した。その結果、代謝プロファイルは非臨床動物種で認められたものと同様であり、このクラスの他のギャップマー型 ASO の代謝プロファイル[Geary, 2015; Yu, 2016; Post, 2019]と同等であった。

すべての非臨床 ADME 試験の詳細を m2.6.4（薬物動態試験の概要文）に示し、これらの試験の一覧表を m2.6.5（薬物動態試験概要表）に示す。

非臨床薬理

ベピロビルセンをヒトに皮下投与することの妥当性を裏付けるため、ICH M3(R2) のガイドライン[ICH, 2009]に従ってデザインした一連の非臨床薬理試験を実施した。効力を裏付ける試験の要約及び一覧表は m2.7.2.4（特別な試験）に示す。副次的薬理試験及び安全性薬理試験の要約は m2.6.2（薬理試験の概要文）に示し、これらの試験の一覧表は m2.6.3（薬理試験概要表）に示す。

2.2. 臨床薬物動態

臨床薬理試験の概要を本項に示す。臨床薬理試験を含む、ベピロビルセンの開発プログラムに含めた臨床試験の一覧を m5.2 に示す。ベピロビルセンの臨床薬理の評価を行った試験の一覧を表 12 に示し、単回及び反復投与後の PK パラメータを表 14 及び表 15 にそれぞれ示す。

2.2.1. 健康被験者の PK

2.2.1.1. 213725 試験（旧称 ISIS 505358-CS1 試験）

試験の標題：A blinded, placebo-controlled, dose-escalation, phase 1 study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of single and multiple doses of bepirovirsen (ISIS 505358, an inhibitor of hepatitis B virus surface antigen) in healthy volunteers（m5.3.3.1, 213725 試験）

本試験では、健康被験者にベピロビルセンを単回又は反復投与した時の PK を評価した。

試験デザイン：最初に 4 用量（75 mg、150 mg、300 mg 及び 450 mg）の単回皮下投与を評価し、続いて 3 用量（150 mg、300 mg 及び 450 mg）の反復投与（Day 1、4、8、11、15 及び 22 の計 6 回投与）を評価した。PK 評価用検体を、単回投与コホートでは Day 15 まで経時的に採取し、反復投与コホートでは Day 1 及び 22 に 24 時間経時的に採取した。ベピロビルセンの 24 時間尿中排泄量を測定した。NCA 法を用いて PK パラメータを算出した。

結果：単回又は反復皮下投与後、ベピロビルセンは速やかに全身循環に吸収され、評価した全用量での tmax の中央値の範囲は 3～8 時間であった。Cmax 及び AUC は用量増加に伴い増加した。用量 150～450 mg で AUC はおおむね用量比例的に増加し、クリアランスは用量間で同程度であった。Cmax に到達後の血漿中ベピロビルセン濃度の平均値は、時間経過に伴い多相的に低下し、初期には比較的速やかな分布相が認められ、その後は緩徐な消失相が認められた（図 1）。単回及び反復投与コホートで、ベピロビルセンの血漿中 PK はおおむね同程度であった。6 回反復投与後の血漿中 Cmax 及び AUC の平均値に蓄積はほとんど又はまったく認められず、ベピロビルセンの PK が時間経過によって変化しないことが示唆された。反復投与コホートで認められた PK パラメータを表 2 に示す。ベピロビルセン未変化体の尿中排泄率はわずかであり、投与後 24 時間以内の尿中排泄率は単回投与後で投与量の 0.5%未満、反復投与後で投与量の 2%未満であった。投与後 24 時間の腎クリアランスがわずかであることは、初期の血漿クリアランスが主に組織への分布であり、排泄によるものではないことと一貫していた（m5.3.3.1, 213725 試験 CSR Table 14.2.5）。

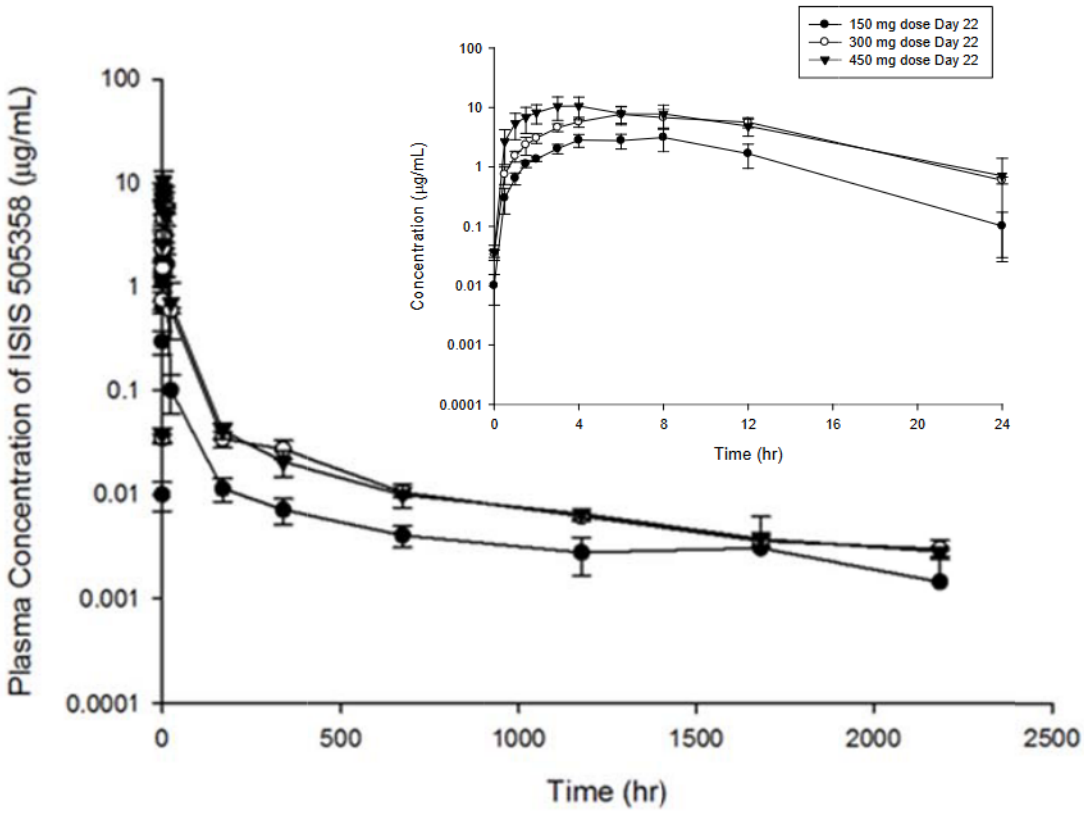
健康被験者のベピロビルセンの PK は、同様のデザインの試験で認められた他のキメラ型 2’-MOE ASO の PK と一貫していた。反復投与コホートの t1/2 の平均値の範囲は 22～24 日であり、ベピロビルセンの組織からの消失が緩徐であるという予測と一貫していた。

表 2 Pharmacokinetic Summary: ISIS 505358-CS1 Multiple Dose

Cohort	Dose (mg)	Day	N	Cmax (µg/mL)	tmax (hr)	AUC(0-24) (µg*hr/mL)	AUC(0-168) (µg*hr/mL)	MRT (0-24) (hr)	CL/F[a] (L/hr)	t1/2 λz (days)
M1	150	22	3	3.69 ± 0.40	8 (4-8)	37.2 ± 2.88	45.3 ± 7.04	8.29 ± 0.859	3.37 ± 0.569	22.4 ± 8.56
M2	300	22	3	7.93 ± 2.23	6 (4-8)	103 ± 19.4	148 ± 14.6	9.19 ± 0.174	2.03 ± 0.206	24.2 ± 6.06
M3	450	22	3	11.0 ± 4.06	3 (2-4)	121 ± 33.3	174 ± 51.4	7.92 ± 1.32	2.75 ± 0.860	24.0 ± 2.35

Source: m5.3.3.1, 213725 CSR, Table 14.2.3
Results presented as mean standard deviation, except for tmax, which is median (range)
a CL/F = Administered Dose/AUC0-168

図 1 Mean (+/-SE) Plasma Concentrations of Bepirovirsen in Multiple Dose Participants from Before Dose on Day 22 through Post-Day 22 Follow-Up Period in Study 213725 (0 through 2184 hours post-Day 22 dose; inset is first 24 hours)



Source: m5.3.3.1, 213725 CSR, Figure 14.2.3.2 and Figure 14.2.3.4

2.2.2. 対象疾患の患者集団の PK

2.2.2.1. 205695 試験（旧称 ISIS 505358-CS3 試験）

試験の標題：A Phase 2, double-blinded, randomized, placebo-controlled, dose-escalation study to examine the safety, tolerability, PK and antiviral activity of bepirovirsen (ISIS 505358) in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B virus infection（m5.3.4.2, 205695 試験）

本試験では、HBV 持続感染患者（NA 治療の併用あり及びなし）にベピロビルセンを反復投与した時の PK を評価した。

試験デザイン：アジア系の HBV 持続感染患者から PK 評価用検体を採取し、2 用量（150 mg 及び 300 mg）のベピロビルセンを反復皮下投与した時の PK を評価した。コホート 1～3 では、Week 1 及び 2 に週 2 回（Day 1、4、8 及び 11）、Week 3 及び 4 に週 1 回（Day 15 及び 22）の計 6 回投与した。コホート 4（探索的コホート）では、安定した NA 治療［テノホビル　ジソプロキシルフマル酸塩（テノホビル）又はエンテカビル水和物（エンテカビル］を受けている被験者にベピロビルセン 300 mg を投与した時の PK を評価した。本試験は以下の 4 コホートから構成された。

- コホート 1：NA 治療を併用していない被験者にベピロビルセン 150 mg 又はプラセボを投与
- コホート 2 及び 3：NA 治療を併用していない被験者にベピロビルセン 300 mg 又はプラセボを投与
- コホート 4：NA 治療を併用している被験者にベピロビルセン 300 mg 又はプラセボを投与

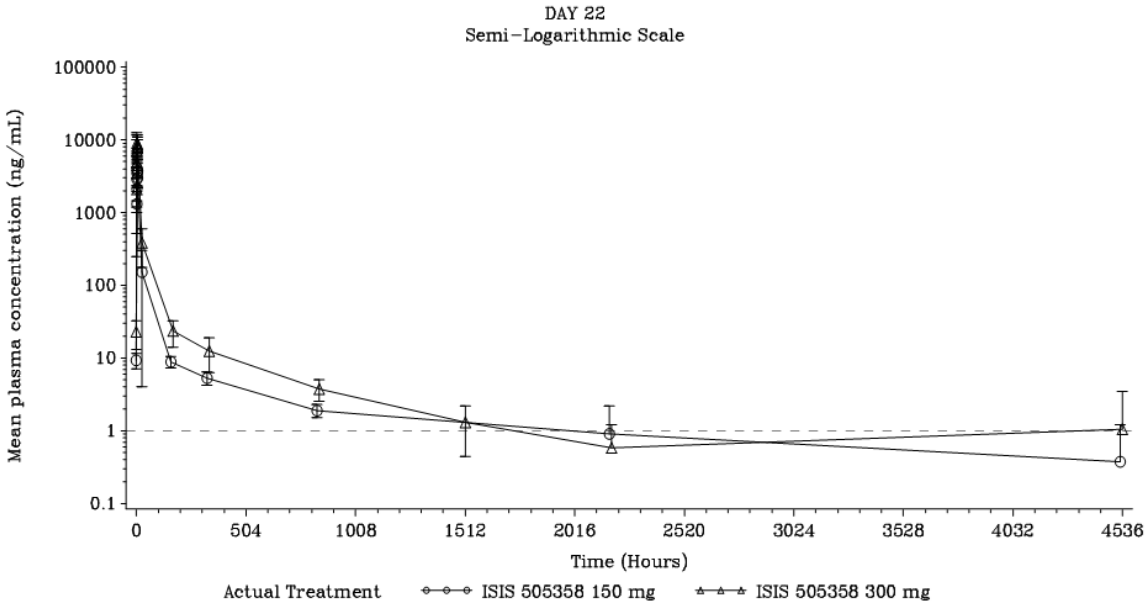
PK 評価用検体を、Day 1 及び 22 に 24 時間経時的に採取した。Day 4、8 及び 15 には、投与前の検体を採取した。NCA 法を用いて、Day 1 及び 22 の PK パラメータを算出した。

結果：tmax はいずれの用量でも同程度であり、投与後 3～5 時間の範囲であった。Cmax 及び AUC は初回投与後（Day 1）及び 6 回目投与後（Day 22）で同程度であり、反復投与後の Cmax 及び AUC の値から、血漿中ベピロビルセンに蓄積は認められないことが示唆された（m5.3.4.2, 205695 試験 CSR Table 14.2.1.2, Table 14.2.1.2a）。Week 1 及び 2 の負荷投与によって、血漿中ベピロビルセン濃度は Day 22 より前に速やかに定常状態に達した。Day 22 にベピロビルセン 150 mg 及び 300 mg を投与した時、Cmax 及び AUC には用量比例的な増加が認められた（表 15）。血漿中ベピロビルセン濃度は多相的に低下し（図 2）、t1/2 の中央値（範囲）はコホート 2 及び 3（ベピロビルセン 300 mg 投与、NA 治療の併用なし）で 16.42（9.29～20.93）日、コホート 4（ベピロビルセン 300 mg 投与、NA 治療の併用あり）で 8.29（7.56～15.51）日であった。

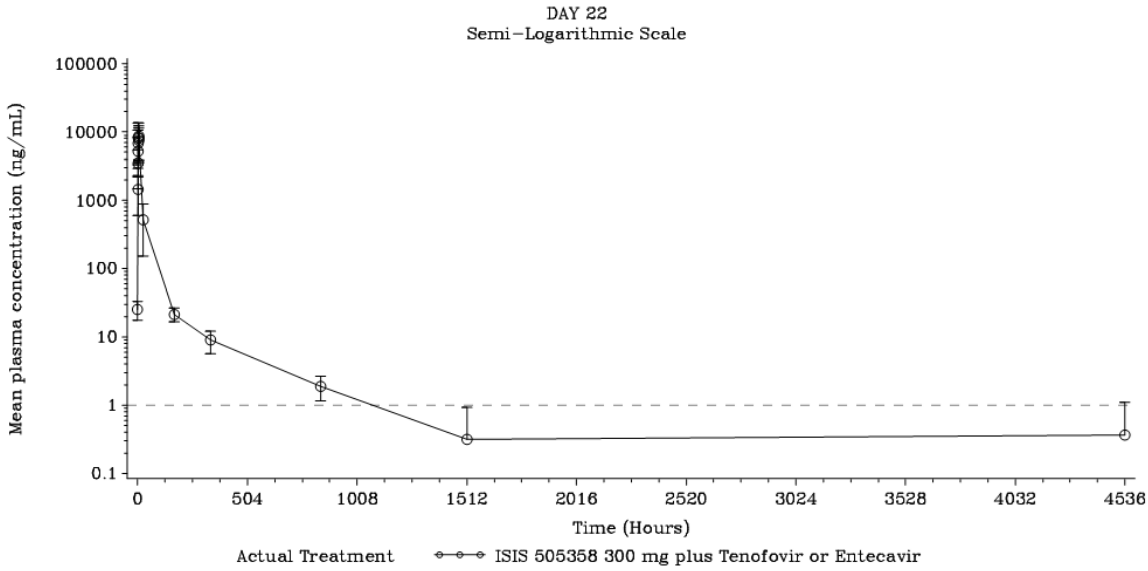
ベピロビルセン 300 mg 皮下投与後のベピロビルセンの血漿中 PK パラメータ及び血漿中濃度-時間推移は、Day 1 及び 22 ともに、エンテカビル又はテノホビルの併用の有無に関わらず同程度であった。なお、テノホビル併用例は 1 例のみであり、本被験者は試験を中止したため Day 22 の投与は受けていない。この結果から、エンテカビルの併用は血漿中ベピロビルセン濃度に影響しないことが示唆された（m5.3.4.2, 205695 試験 CSR Table 14.2.1.2, Table 14.2.1.2a）。

図 2　Mean (+/-SD) Bepirovirsen Plasma Concentration-Time Plot Following The Sixth Injection on Day 22 (0 to 4536 hours) (Study 205695)

a. Cohorts 1 to 3



b. Cohort 4



Source: m5.3.4.2, 205695 CSR, Figure 14.2.2.1 and Figure 14.2.2.1a
Dashed line represents the lower limit of quantification for the assay.
One participant in Cohorts 1 - 3 did not receive the scheduled Day 22 dose, all data post-Day 22 is excluded from summary statistics, statistical analysis, mean and median plots.

また、NA の曝露量は、ベピロビルセンとの併用投与、及びベピロビルセンの事前投与の影響を受けないと考えられた。

2.2.2.2. B-Clear 試験

試験の標題：Phase 2b multi-center, randomized, partial-blind parallel cohort study to assess the efficacy and safety of treatment with bepirovirsen in participants with chronic HBV［m5.3.5.1, 209668（B-Clear）試験］

本試験では、HBV 持続感染患者にベピロビルセンを 3 つの用法・用量で投与した時の PK を評価した。また、PK と有効性及び安全性の関係を評価した。

試験デザイン：2 つの HBV 持続感染患者集団を対象に、血漿中 PK を評価した。コホート 1 には NA 治療を受けている HBV 持続感染患者を組み入れ（On-NA コホート）、コホート 2 には NA 治療を受けていない HBV 持続感染患者を組み入れた（Not-on-NA コホート）。各コホートの被験者（NA 治療を受けている、又は受けていない被験者）を、以下の並行する 4 群のいずれかにランダム化した。

- 第 1 治療群：ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）
- 第 2 治療群：ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 12 週間皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）した後、ベピロビルセン 150 mg 及び被験者の盲検維持のためマッチングプラセボを週 1 回 12 週間投与（ステップダウン）
- 第 3 治療群：ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 12 週間皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）した後、プラセボを週 1 回 12 週間投与
- 第 4 治療群：プラセボを週 1 回 12 週間投与した後、ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 12 週間皮下投与（Day 4 及び 11 にマッチングプラセボを投与し、ベピロビルセンの負荷投与を実施しない）

治療期間中にベピロビルセンの PK 評価用検体を各来院時点（Day 4 及び 11 を除く）の投与前に採取し、後観察期間中に各来院時点で 1 検体採取した。また、PK 評価用検体を経時的に採取する被験者集団を設定し、血漿中ベピロビルセン及び NA 濃度を評価した。本集団には日本及び非アジア圏の国の NA 治療を受けている被験者を含め、Week 14～24 のうちの 1 回の来院時点で経時的な検体採取を実施した。本集団の被験者の内訳は、日本人集団及び非アジア人集団で、それぞれベピロビルセン 300 mg を週 1 回投与された被験者（第 1 及び第 4 治療群）6 例、ベピロビルセン 150 mg を週 1 回投与された被験者（第 2 治療群）6 例、及びプラセボを投与された被験者（第 3 治療群）1 例であった。

結果：ベピロビルセンを週 1 回投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）した時、Ctrough の平均値はいずれの週でも同程度であり、Week 2 より前に速やかに定常状態に達したことが示唆された（m5.3.5.1, B-Clear 試験 CSR Figure 104.4）。第 1 治療群の Ctrough の平均値は、On-NA コホートと Not-on-NA コホートで同程度であった（m5.3.5.1, B-Clear 試験 CSR Table 104.6, Table 204.6）。第 2 治療群の Ctrough の平均値は、ベピロビルセン（週 1 回投与）の用量を 300 mg から 150 mg に減量すると減少した。第 4 治療群（ベピロビルセン 300 mg を週 1 回投与し、負荷投与を実施しない）では、ベピロビルセン投与開始後約 5 週間までに定常状態に達した。全コホートの全治療群（NA 治療を受けている被験者及び受けていない被験者）で、t1/2 の中央値の範囲は 15.7～38.2 日であった。

経時的に検体を採取した PK 集団のベピロビルセンの AUC(0-24)、AUC(0-tau)、Cmax 及び tmax を表 3 に示す。

表 3　Summary of Plasma Pharmacokinetic Parameters of Bepirovirsen in Arm 1 of Study 209668 (Intensive PK Population in On NA Cohort)

	AUC(0-24) (hr*µg/mL)	AUC(0-tau) (hr*µg/mL)	Cmax (µg/mL)	tmax (hr)
Bepirovirsen 300 mg weekly for 24 weeks (N=12)				
N	12	12	12	12
Mean (SD)	140.312 (37.3548)	152.701 (39.9564)	14.956 (5.6592)	3.158 (0.8007)
Median (Min, Max)	146.206 (66.16, 201.49)	156.306 (72.46, 216.23)	15.300 (5.95, 25.00)	3.017 (2.00, 5.00)
Geo mean (CV% geo mean)	134.985 (31.31)	147.042 (30.97)	13.897 (43.36)	3.071 (24.91)

Source: m5.3.5.1, 209668 (B-Clear) CSR, Table 104.5

2.2.2.3.　B-Fine 試験

試験の標題：An open label, single arm study to mechanistically interrogate the therapeutic effect of bepirovirsen in patients with chronic hepatitis B via intrahepatic immunophenotyping［m5.3.5.2, 212602（B-Fine）試験］

本試験では、HBV 持続感染患者へのベピロビルセンの 12 週間投与が血清 HBs 抗原量に及ぼす PK 的影響を評価した。

試験デザイン：本試験は単群試験であり、安定した NA 治療を受けている被験者にベピロビルセン 300 mg を週 1 回 12 週間皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）し、その後 24 週間の後観察期間を設定した。治療期間中に PK 評価用検体を週 1 回の来院時点（Day 4 及び 11 を除く）の投与前に採取し、後観察期間にはベピロビルセンの投与終了から 24 週後まで検体を採取した。検体の採取時点の詳細を m5.3.5.2, B-Fine 試験 CSR に示す。

結果：ベピロビルセン 300 mg を週 1 回皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）した時、Ctrough の平均値はいずれの週でも同程度であり、Week 2 より前に定常状態に達したことが示唆された（m5.3.1.2, B-Fine 試験 CSR Figure 4.3）。各来院時点のベピロビルセンの Ctrough の平均値は 0.017～0.026 µg/mL の範囲であった。血漿中ベピロビルセン濃度は、後観察期間の Week 8～12 におおむね<LLOQ まで低下したため、ベピロビルセンの t1/2 が推定可能であった被験者は 12 例中 5 例であった。ベピロビルセンの t1/2 の中央値（範囲）は 16.738（13.48～45.59）日であった。

2.2.2.4.　B-Together 試験

試験の標題：A Phase 2b multi-center, randomized, open label study to assess the efficacy and safety of sequential treatment with bepirovirsen followed by PegIFN alpha 2a in participants with chronic HBV［m5.3.5.1, 209348（B-Together）試験］

本試験では、安定した NA 治療を受けている HBV 持続感染患者にベピロビルセン（300 mg を週 1 回、12 又は 24 週間）投与後に PegIFN（180 μg を週 1 回、最大 24 週間）を投与した時のベピロビルセンの PK 及び PD を評価した。

試験デザイン：ベピロビルセン投与期間中、Day 4 及び 11 にベピロビルセン 300 mg を負荷投与した。試験期間中、被験者は NA 治療を継続した。被験者を以下のいずれかの並行群に 1:1 の比率でランダム化した。

- 第 1 治療群：ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）した後、PegIFN を投与した。PegIFN の投与終了後に後観察期間を設定し、被験者を更に 24 週間追跡した。
- 第 2 治療群：ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 12 週間皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）した後、PegIFN を投与した。PegIFN の投与終了後に後観察期間を設定し、被験者を更に 36 週間追跡した。

両治療群から、ベピロビルセンの PK 評価用検体を Week 1（Day 1 及び 4）、2（Day 8 及び 11）、6 及び 12 の投与前に採取した。第 1 治療群からは Week 18 及び 24 の投与前にも採取した。更に、ベピロビルセンの投与終了から 1、3、6、10 及び 13 週後にも検体を採取した。

結果：ベピロビルセン 300 mg を週 1 回皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）した時、Ctrough の平均値はいずれの週でも同程度であり、Week 2 より前に速やかに定常状態に達したことが示唆された。各来院時点のベピロビルセンの Ctrough の平均値の範囲は、ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間投与した第 1 治療群では 0.011～0.025 μg/mL であり、300 mg を週 1 回 12 週間投与した第 2 治療群では 0.012～0.027 μg/mL であった。ベピロビルセンを皮下投与した時の t1/2 の中央値（範囲）は、ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間投与した第 1 治療群では 20.5（7.65～54.80）日であり、300 mg を週 1 回 12 週間投与した第 2 治療群では 20.8（13.10～53.90）日であった。

2.2.2.5. B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験

試験の標題：

B-Well 1: Phase 3 multicenter, randomized, double-blind, study to assess the efficacy and safety of treatment with bepirovirsen in NA treated participants with chronic HBV infection［m5.3.5.1, 202009（B-Well 1）試験］

B-Well 2: Phase 3 multicenter, randomized, double-blind, study to assess the efficacy and safety of treatment with bepirovirsen in NA treated participants with chronic HBV infection［m5.3.5.1, 219288（B-Well 2）試験］

B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験では、ベースラインの HBs 抗原量が≤3000 IU/mL の NA 治療を受けている HBV 持続感染患者に、FC 達成を目的としてベピロビルセンを 24 週間投与（負荷投与を含む）した時の PK 及び PD を評価する。また、免疫原性並びに PK と有効性及び安全性の関係を評価する。

試験デザイン：両試験の試験デザインは同一であり、以下に示す 4 期間から構成された。

- 二重盲検投与期（24 週間）
- NA 単独治療期（24 週間）
- NA 中止期（24 週間の後観察期）又は NA 治療継続期（24 週間）
- NA 治療を中止した被験者の効果の持続性評価及び後観察期（Week 72～96 の 24 週間）

PK 評価用検体を、Week 1（Day 1）の投与前、Week 4 の投与前、Week 12 の投与 2.5 時間後、Week 18 の投与前、Week 24 の投与前、並びに Week 28、36 及び早期中止来院時に採取した。

結果：ベピロビルセン 300 mg を週 1 回皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）した時、Ctrough の平均値は両試験のいずれの週でも同程度であり、各来院時点の Ctrough の平均値の範囲は B-Well 1 試験で 18.743～27.535 ng/mL、B-Well 2 試験で 17.226～26.329 ng/mL であった。12 週間の治療期間後のベピロビルセンの C2.5hr の平均値は、B-Well 1 試験で 7176.914 ng/mL、B-Well 2 試験で 6899.781 ng/mL であった。Ctrough 及び C2.5hr の平均値は、B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験で一貫していた（m5.3.5.1, B-Well 1 試験 CSR Table 4.01, Figure 4.01、B-Well 2 試験 CSR Table 4.01, Figure 4.01）。

結論：ベピロビルセン 300 mg を週 1 回皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）した時、Ctrough の平均値は両試験のいずれの週でも同程度であった。Ctrough の平均値は B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験で一貫していた。

2.2.3. 特別な患者集団の PK

2.2.3.1. B-Assured 試験－肝機能低下者の PK

試験の標題：A Phase 1, open-label, single-dose study to evaluate the PK of bepirovirsen in adults with hepatic impairment and healthy matched control participants［m5.3.3.3, 205871（B-Assured）試験］

本試験では、ベピロビルセン 300 mg を単回皮下投与した時の血漿中 PK パラメータに肝機能低下が及ぼす影響を評価した。

試験デザイン：本試験では、HBV 持続感染を有さない肝機能低下者を肝機能正常者と比較した。本試験では Part 1 及び 2 を計画し、Part 1 では中等度肝機能低下者を、Part 2 では軽度肝機能低下者を対象とする計画であったが、治験実施計画書の規定に従い Part 2 は実施しなかった（m5.3.3.3, B-Assured 試験 CSR）。ベピロビルセンの PK 評価用検体を、投与前及び投与後 168 時間まで経時的に採取した。その後、投与 2、4 及び 7 週後に検体を採取した。NCA 法を用いて PK パラメータを算出した。

結果：中等度肝機能低下者と、性別、年齢、人種及び合計体重をマッチングした肝機能正常被験者（健康被験者）にベピロビルセンを単回投与した時、tmax の中央値はおおむね投与 4 時間後であった。中等度肝機能低下者の血漿中ベピロビルセン濃度の平均値は、健康被験者と比較して一貫して低かったが、濃度の範囲は被験者群間で重複した（m5.3.3.3, B-Assured 試験 CSR Figure 4.10）。曝露量のパラメータである Cmax、AUC(0-inf)、AUC(0-24)及び AUC(0-168)の幾何最小二乗平均値は、健康被験者と比較して中等度肝機能低下者でそ

れぞれ約 33%、31%、36%及び 32%低かった（m5.3.3.3, B-Assured 試験 CSR Table 4.7）。t1/2 の推定値は被験者群間で同程度であり、幾何最小二乗平均値の比は 1.13 であった。

Part 1 のデータを中間解析した結果、健康被験者に対する中等度肝機能低下者のベピロビルセンの AUC(0-inf)及び Cmax の幾何最小二乗平均値の比は、治験実施計画書で規定した範囲内（0.5 以上 1.5 以下）であった。被験者群間で事前に定義した差が認められなかったため、FDA のガイダンスに基づき[FDA, 2003]、Part 1 の結果を軽度肝機能低下者に適用できると考え、Part 2 を実施しなかった。したがって、軽度肝機能低下者（Child-Pugh 分類 A の肝硬変）及び肝機能正常者で、ベピロビルセンの PK パラメータに差はないと予測される。

2.2.4. DDI 試験

ベピロビルセンに特化した臨床 DDI 試験は実施されなかった。

In vitro DDI 試験に関する考察を Section 2.1 及び m2.6.4（薬物動態試験の概要文）に示し、これらの試験から得られたデータの要約表を m2.6.5（薬物動態試験概要表）に示す。PopPK モデルを用いてベピロビルセンを被相互作用薬又は相互作用薬として評価した結果（Section 3.2）、ベピロビルセンにより臨床的に重要な DDI が発現する可能性は低いと考えられた。

2.3. 臨床薬力学

ベピロビルセンの作用機序及び薬力学に関する考察を、Section 3.5 及び Section 3.6 並びに m2.7.3、m2.5 及び m2.7.2.4 に示す。

2.4. 濃度-反応関係

2.4.1. 非臨床試験

hERG 電流に及ぼす影響を評価した試験

本試験の目的は、hERG cDNA を安定的に導入したヒト胎児腎細胞（HEK-293）を用いて、hERG イオンチャネルに対するベピロビルセンの作用を検討し、ベピロビルセンが hERG テール電流に及ぼす影響を評価することであった。hERG 電流を阻害する化合物は、ヒトの心臓活動電位の延長、及びそれに伴う QT 間隔の延長を引き起こすことが示されている。詳細を m2.4, Section 2.2 及び m2.6.2, Section 4.2.1.1 に示す。

ベピロビルセン 190 μM（1.39 mg/mL）で処理した時の hERG チャネルテール電流に対する影響を媒体で処理した時と比較した結果、統計学的に有意な差は認められなかった。本試験に用いたベピロビルセンの濃度は、MHRD から推定される血漿中遊離型 Cmax の平均値（約 0.06 μM）と比較して 3309 倍高値であった。

サルを用いた心血管試験

本試験の目的は、覚醒カニクイザルにベピロビルセンを 1 時間かけて単回静脈内投与又は単回皮下投与した時の動脈圧、心拍数、呼吸数、動脈血ガス、中核体温及び第 2 誘導 ECG パラメータへの影響を評価することであった。

ベピロビルセンを最大 40 mg/kg まで単回投与した時の ECG の波形又は形態に、臨床的な徴候及び影響は認められなかった。この時のサルの血中ベピロビルセンの濃度は、MHRD から推定される血漿中遊離型 Cmax の平均値と比較して 4.4 倍高値であった（ヒトとサルの蛋白結合の違いを考慮して算出）（m2.4, Section 2.2, m2.6.2, Section 4.2.2.1）。

2.4.2. QTcF への影響を評価する試験

試験の標題：A phase 1, randomized, double-blinded, placebo-controlled, parallel group study to evaluate the effect of bepirovirsen on cardiac conduction as assessed by 12-lead ECG in healthy volunteers（m5.3.5.4, 205873 試験）

本試験では、健康被験者に臨床用量よりも高用量のベピロビルセンを投与し、曝露-反応モデルを用いてベピロビルセンの血漿中曝露量が QTcF へ及ぼす影響を Cmax 時点で評価する。

試験デザイン：Day 1 に健康成人被験者を、ベピロビルセン（600 mg 又は 450 mg）又はプラセボを単回皮下投与するいずれかの群に 1:1 の比率でランダム化した。最初にベピロビルセン 600 mg を 5 例、プラセボを 5 例（計 10 例）に投与した。その後、治験実施計画書の改訂に従い、残りの 36 例にはベピロビルセン 450 mg 及びプラセボをそれぞれ 18 例に投与した。投与 72 時間後まで、治験実施計画書の規定時間に合わせて、PK 評価用検体の採取及び ECG の記録を実施した。線形混合効果モデルを用いた濃度-QT 解析で、ベピロビルセン濃度と ΔQTcF の関係を評価した。Cmax を用いて、臨床用量及び臨床用量よりも高用量での曝露に対応する ΔQTcF の 90% CI の上限を予測した。

結果：本試験に組み入れられた健康被験者 46 例全例を QT/QTcF 解析の対象とし、23 例を PK 解析対象とした。血漿中 PK パラメータの結果を m5.3.5.4, 205873 試験 CSR Table 4.02 及び Table 4.03 に示す。ベピロビルセンの血漿中濃度は 450 mg よりも 600 mg の方が高く、用量比を下回って増加した。

ベピロビルセンの投与は QTc 間隔に臨床的に意味のある影響を及ぼさなかった。QTcF を用いた濃度-QT 解析の結果、QTcF のベースラインからの変化量のプラセボとの差（ΔΔQTcF）の幾何平均値（90% CI）は、ベピロビルセン 450 mg 及び 600 mg 投与後の Cmax の幾何平均値においてそれぞれ 2.024（-0.541, 4.589）及び 2.360（-0.249, 4.970）msec であり、臨床的に重要な閾値の 10 msec を下回った（m5.3.5.4, 205873 試験 CSR Table 8.02）。

ベピロビルセンの Cmax（いずれの用量でも 1 日目の 4 時間）と ΔΔQTcF を指標とした QT 間隔への影響の間に遅延が認められたことから（450 mg 及び 600 mg の用量でそれぞれ投与後 30 時間及び 33 時間に最大の ΔΔQTcF が認められた）、観察された QT 間隔の変化はベピロビルセンの曝露量が心拍数に及ぼす影響を介している可能性が示唆された。

いずれの用量においても、ベピロビルセン投与後に 10 bpm を超える心拍数増加が認められたため、QT 間隔を個別に補正した ΔΔQTcI を用いて追加解析を実施したところ、ΔΔQTcF を用いた際の解析結果と一致した。ベピロビルセン 450 mg 及び 600 mg 投与後の Cmax の幾

何平均値における ΔΔQTcI の 90% CI の上限はそれぞれ 2.777 及び 3.006 msec であり、ベピロビルセンは QT 間隔に臨床的に重要な影響を及ぼさないことが確認された。

結論：ベピロビルセンを臨床用量又は臨床用量よりも高用量で投与した時、臨床的に重要な QTcF 延長は認められないと考えられた。

3. 全試験を通しての結果の比較と解析

3.1. 臨床薬理

3.1.1. 概観（ADME）

吸収：HBV 持続感染患者にベピロビルセン 300 mg を皮下投与した時、ベピロビルセンは速やかに吸収された。Tmax の中央値は 3 時間であり（m5.3.5.1, B-Clear CSR）、定常状態の Cmax の平均値は 9.14 µg/mL であった（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report）。

分布：ベピロビルセンは高いヒト血漿蛋白結合率を示し（≥95%）、血漿中濃度が低いと結合率が上昇する[Davies, 1993]。PopPK 解析から推定された見かけの分布容積の代表値は 70.9 L と体内総水分量（体重 70 kg の場合 42 L）を上回り、ベピロビルセンが組織へ広範に分布することが示唆された。血漿中ベピロビルセン濃度は多相的に速やかに低下し、初期にはベピロビルセンの血漿中から組織への速やかな移行に伴う分布相が認められた。その後は緩徐な終末消失相が認められ、他の ASO のプロファイルと一致するものであった。投与 7 日後の血漿中濃度は Cmax の<0.2%であった（m5.3.3.1, 213725 試験 CSR Figure 4）。

代謝：ベピロビルセンは CYP 代謝の基質ではなく、組織内でエンドヌクレアーゼにより代謝され、短鎖オリゴヌクレオチドとなり、その後エキソヌクレアーゼにより更に代謝される。このクラスの化学修飾 ASO は体内の組織に広範に分布し、一般的に肝臓及び腎臓で高濃度となることが知られている[Geary, 2015; Yu, 2007]。

排泄：緩徐な終末消失相は、血漿中濃度及び組織中濃度が平衡状態にあることを反映するものである。ベピロビルセンは組織で代謝され、短鎖オリゴヌクレオチドとなって腎臓から排泄される（m2.6.4, Section 3.1.2）。反復投与後に尿中排泄される未変化体は少量であり、投与量の<2%であった。皮下投与後の血漿中 t1/2 は約 29 日であった（m5.3.5.1, B-Clear CSR）。PopPK 解析から算出された、CL/F の代表値は 2.99 L/hr であった。生理学的薬物速度論モデルから、肝臓全体及び細胞内消失半減期は 37 日と予測された（m2.6.4, Section 3.1.2）。

3.1.2. PopPK 解析

皮下投与後のベピロビルセンの血漿中 PK プロファイルを表現すること、並びに共変量が曝露量に及ぼす影響を定量化することを目的に、PopPK モデルを構築した。

方法：健康被験者を対象とした試験（213725 試験、205871 試験及び 219239 試験）及び HBV 持続感染患者を対象とした試験（205695 試験、B-Fine 試験、B-Clear 試験、B-Together 試験、B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験）の PK データを統合した。PopPK モデルの構築には、1966 例から得られた計 22927 件の血漿中濃度の実測値を使用した（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report Section 6.1）。

内因性及び外因性因子［年齢、体重、民族、人種、性別、軽度腎機能障害（eGFR が 60～90 未満 mL/min/1.73 m^2）、SCr、アルブミン、疾患（HBV 持続感染）の有無、NA 治療の有無、注射部位及び ADA の有無］の共変量の影響を評価した。

結果：皮下投与されたベピロビルセンの PK は、吸収コンパートメントからのラグタイムを伴う一次皮下吸収、中央コンパートメントへの分布及び中央コンパートメントから 2 つの異なる末梢コンパートメントへの分布、並びに中央コンパートメントからの線形消失からなる、3 コンパートメントモデルで十分に特徴付けられた（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report Section 6.5.2）。Goodness-of-fit プロット及び pcVPC プロットにより、PopPK モデルはベピロビルセン濃度の経時変化を記述するのに十分であり、シミュレーション目的に適していることが示された（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report Section 6.5.2, 6.5.3.1）。

体重は、CL/F 及び V2/F に対する統計学的に有意な共変量であり、ADA の有無は、CL/F に対する有意な共変量であった。体重及び ADA の影響を考慮した後、共変量検定において、臨床的に注目すべきその他の人口統計学的特性及びベースライン特性［年齢、人種、民族、性別、軽度腎機能障害、SCr、アルブミン、疾患（HBV 持続感染）の有無、NA 治療の有無及び注射部位を含む］は、共変量として特定されなかった。その他のベースライン特性（CRCL、eGFR、総ビリルビン、AST、ALT、HBs 抗原量、HBe 抗原の有無、METAVIR 線維化スコア及び Fibro Test スコア）は、探索的な共変量評価から共変量として特定されなかった。共変量効果を含む PopPK パラメータ推定値を表 16 及び表 17 に示す。

標準的な体重 71 kg の HBV 持続感染患者のベピロビルセンの CL/F は 2.99 L/hr であった。最終 PopPK モデルを用いて、異なる部分集団におけるベピロビルセンの曝露量をシミュレーションした。

各部分集団の年齢、体重、ADA の有無並びに人種及び民族別のシミュレーションの結果をそれぞれ Section 3.3.1、Section 3.3.2、Section 3.3.3 及び Section 3.3.4 に示す。

3.2. DDI

ベピロビルセンは主にエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによって代謝される。in vitro 薬物代謝試験の概要についての考察を Section 2.1 に示す。臨床データを用いた追加評価の要約を以下に示す。

3.2.1. 被相互作用薬としての DDI

PopPK モデルで、NA 治療の併用の有無を共変量として評価した結果、NA 治療の併用はベピロビルセンの PK に対する有意な共変量ではなかった。NA 治療及び頓服薬（例：パラセタモール、イブプロフェン）以外に B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験の被験者集団の>10%で用いられたその他の併用薬はなく、PopPK モデルによる共変量解析における併用薬は NA 治療のみであった（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report Section 5.4.2）。

PopPK モデルによる共変量解析に加え、臨床試験からも、NA 治療の併用によりベピロビルセンの PK に変化は認められなかった。205695 試験で、ベピロビルセン 300 mg をコホート 2 及び 3 では NA 治療の併用なし、コホート 4 では NA 治療（テノホビル又はエンテカビ

ル）の併用ありで投与した。Day 1 及び 22 のベピロビルセン 300 mg 皮下投与後の PK パラメータ及び濃度-時間推移は、NA 治療（テノホビル又はエンテカビル）の併用の有無に関わらず同程度であり、NA 治療の併用はベピロビルセンの血漿中 PK に影響を及ぼさないことが示唆された（Section 2.2.2.1）。B-Clear 試験での血漿中ベピロビルセン濃度は、NA 治療を併用しない被験者と併用する被験者で同程度であった（Section 2.2.2.2）。

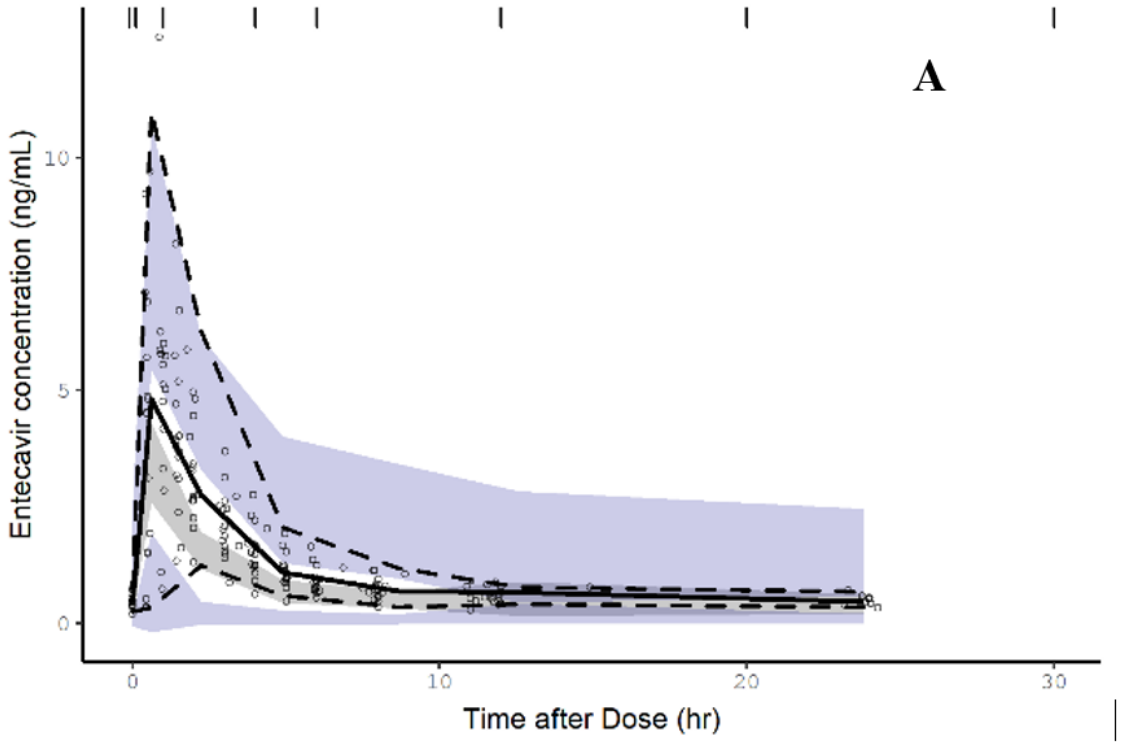
以上より、併用薬はベピロビルセンの PK に影響を及ぼさず、ベピロビルセンは臨床的に重要な被相互作用薬ではないと予想される。

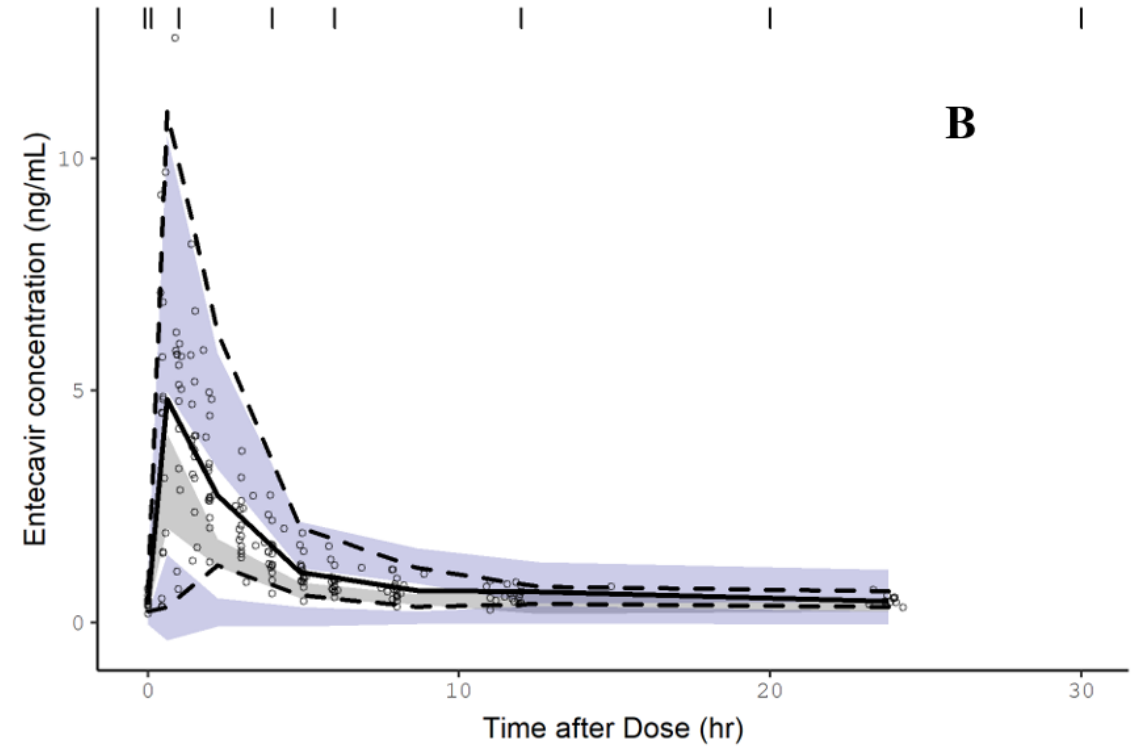
3.2.2. 相互作用薬としての DDI

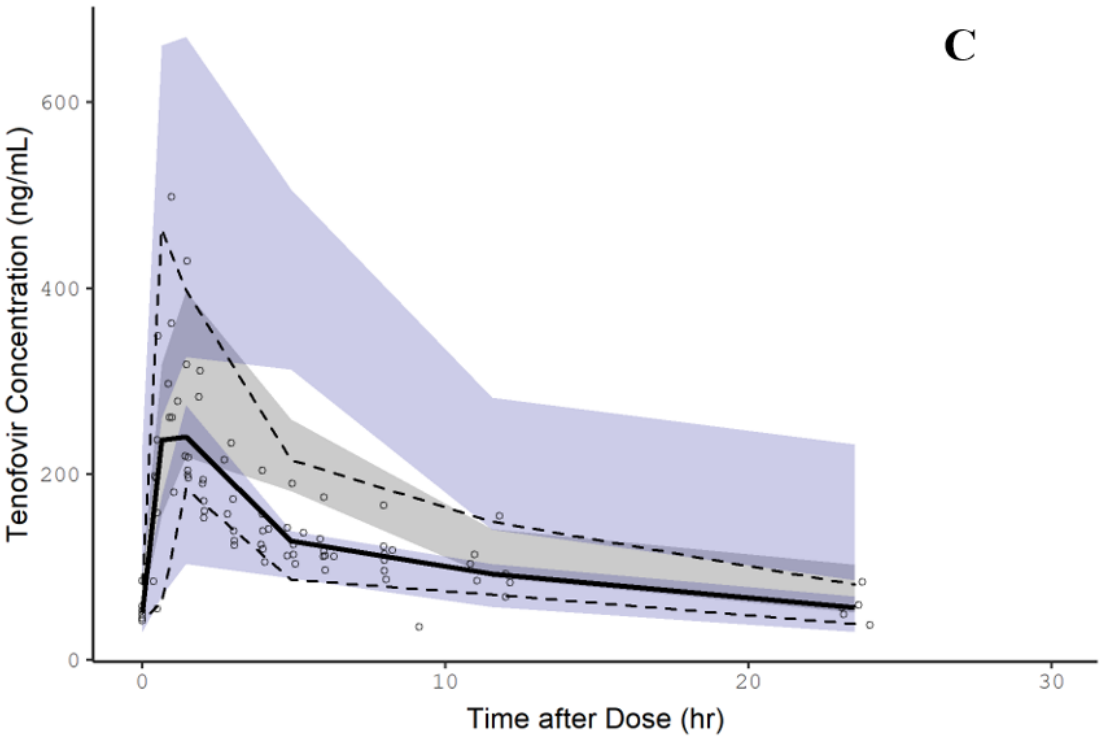
ベピロビルセンとの併用が NA（エンテカビル及びテノホビル）の曝露量に及ぼす影響をシミュレーションに基づき評価した。

B-Clear 試験で HBV 持続感染患者から経時的に採取した NA の PK データを、文献で公開されている PopPK モデルを用いてシミュレーションしたエンテカビル及びテノホビルの PK プロファイルと比較した。その結果、ベピロビルセンとの併用時に得られた NA の PK データが、既存の PopPK モデルから得られた PK プロファイルとおおむね一致することが示されたことから、ベピロビルセンは NA の PK に影響を及ぼさないと考えられた（図 3）（m5.3.3.4, NA PK report）。以上より、ベピロビルセンは臨床的に重要な相互作用薬ではないと予測された。

図 3 Visual Predictive Check based on the Population PK Model Overlaid with Observed Data from Phase 2b Study 209668







Source: m5.3.3.4, NA PK report, Figures 2, 3 and 4.
Panel A and B: Published popPK models for entecavir from [Zhu, 2008] and [Chan, 2016], respectively.
Panel C: Published popPK models for tenofovir from [Jullien, 2005]
Observed data: individual (dots), 5th (dashed), 50th (solid) and 95th (dashed) percentiles.
Predicted data (shaded): 5th (lower blue), 50th (gray) and 95th (upper blue) percentiles of the prediction intervals.

3.3. 内因性要因

3.3.1. 年齢

18 歳未満の患者に対するベピロビルセンの安全性及び有効性は評価されていない。

PopPK 解析に含めた被験者のベースラインの年齢の範囲は 18～87 歳であり、65 歳以上の割合は 8.1%であった。最終 PopPK モデルで年齢を連続共変量及びカテゴリカル共変量（65 歳未満又は 65 歳以上）として評価した結果、年齢はベピロビルセンの PK の共変量ではなかった（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report Table 2）。

2 つの年齢群［成人（18～65 歳未満）及び高齢者（65 歳以上）］に対して体重差を考慮したシミュレーションを実施した結果、高齢者及び成人の年齢群でのベピロビルセンの血漿中濃度は同程度であった（表 4）。

表 4 Summary of Population PK Model-Predicted Steady-State Exposures for Bepirovirsen 300 mg SC Weekly for 24 Weeks by Age Group in Participants with chronic HBV infection

Age Group	Plasma Parameter Mean (SD)			
	N	AUC(0-tau),ss (µg*h/mL)	Cmax,ss (µg/mL)	Ctrough,ss (µg/mL)
Adult 18 to <65 years	1076	100 (31.1)	9.06 (2.19)	0.0211 (0.0355)
Elderly ≥ 65 years	127	114 (52.7)	9.79 (2.09)	0.0315 (0.0919)

Source: m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report, Table 4.

結論：高齢患者（65 歳以上）に対するベピロビルセンの用量調整は不要である。

3.3.2. 体重

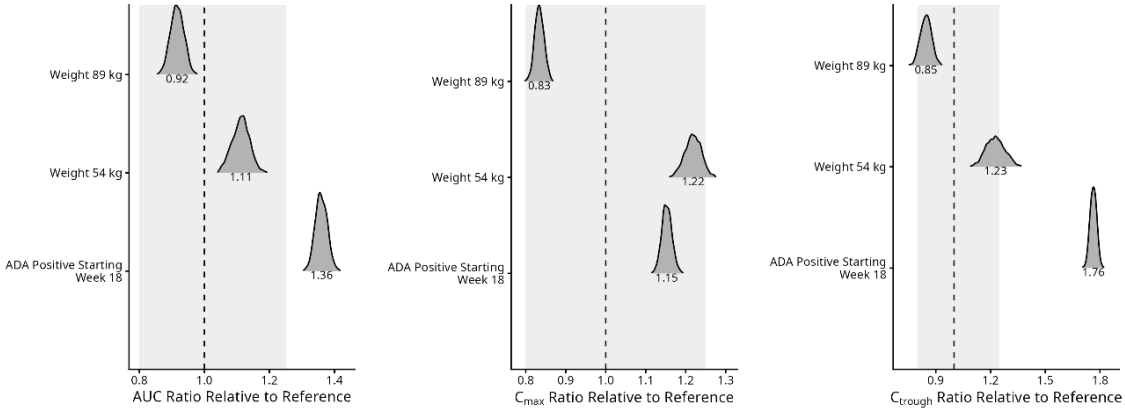
最終 PopPK モデルにおいて、体重はベピロビルセンの CL/F 及び V2/F に対する有意な共変量であった。PopPK モデルに基づきシミュレーションした体重の四分位別におけるベピロビルセンの定常状態の Cmax、AUC(0-tau)及び Ctrough を表 5 に要約する（Section 3.1.2）。体重の 10 パーセンタイル（54 kg）又は 90 パーセンタイル（89 kg）と中央値（71 kg）との間のベピロビルセンの曝露量の差は<25%であり、体重の違いによりベピロビルセンの曝露量に臨床的に意味のある差は認められなかった（図 4）。

表 5 Summary of Population PK Model-Predicted Steady-State Exposures for Bepirovirsen 300 mg SC Weekly for 24 Weeks by Weight in Participants with chronic HBV infection

Baseline Body weight	Plasma Parameter Mean (SD)			
	N	AUC(0-tau),ss (µg*h/mL)	Cmax,ss (µg/mL)	Ctrough,ss (µg/mL)
39 to 61.3 kg	301	110 (27.6)	11.0 (2.06)	0.0236 (0.0159)
61.3 to 70.3 kg	302	98.4 (27.6)	9.28 (1.71)	0.0212 (0.0261)
70.3 to 80.0 kg	326	101 (36.3)	8.69 (1.74)	0.0218 (0.0573)
80.0 to 148 kg	273	96.7 (42.8)	7.45 (1.63)	0.0222 (0.0630)

Source: m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report, Table 4.

図 4　Effects of Statistically Significant Covariates on Bepirovirsen PK Exposure



Source: m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report, Figure 15
The grey shaded area represents 0.80-1.25-fold of the reference group.
Weights represent the 10th and 90th percentiles of observed body weight in the combined Phase 3 studies. The reference median (50th percentile) body weight is 71 kg.
The estimated ADA effects assume each participant's ADA status (i.e., either negative or positive) remained unchanged during the study. The reference ADA status is negative.

有効性に対する体重の影響を評価するため、異なる体重カテゴリーについて PopPK-HBs 抗原解析に基づくシミュレーションを実施した。その結果、体重別の有効性に臨床的に意味のある差は認められなかった（Section 3.6.1、表 8）。同様に、PopPK-血小板解析に基づくシミュレーションから、体重別の血小板減少症の発現割合はおおむね同様であることが示された（表 11）。

結論：HBV 持続感染患者での体重に基づくベピロビルセンの用量調整は不要である。

3.3.3.　ADA の影響

PopPK モデルを用いてベピロビルセンの PK に対する ADA の影響を評価したところ、ADA の発現は CL/F に対する統計学的に有意な共変量であり、ADA 陽性被験者で CL/F が 26.6%低下した。Week 24 において、ADA 陽性被験者は ADA 陰性被験者と比較して定常状態の AUC(0-tau)、Cmax 及び Ctrough がそれぞれ 1.36 倍、1.15 倍及び 1.76 倍高いと予測された。ADA の発現の多くはベピロビルセン投与後期及び休薬期間中に認められた（図 4、m5.3.3.5, Ph 3 PopPK Report Section 6.6.1）。

他の ASO と同様に[Grudzinska-Goebel, 2025]、ADA は全身循環中でベピロビルセンに結合し、組織曝露量又は薬理作用に大きな影響を及ぼすことなく消失が若干遅延すると予想され、ADA の有無による曝露量の差がベピロビルセンの有効性又は安全性プロファイルに臨床的に意味のある変化を引き起こすとは考えにくい（m5.3.3.5, Ph 3 PopPK Report Section 6.6.1）。

PopPK-HBs 抗原解析及び PopPK-血小板解析において、η-共変量プロットを用いて ADA の影響をスクリーニングしたところ、ベピロビルセンの PD パラメータに対する ADA の影響は認められなかった。さらに、PopPK-血小板モデルに基づくシミュレーションでは、ADA

の有無別の血小板減少症の発現割合に臨床的に意味のある違いは認められなかった（表11、m5.3.4.2, Ph 3 PopPK-PD Report [TMF-22893867] Section 6.3.6.1）。

結論：HBV 持続感染患者での ADA 有無によるベピロビルセンの用量調節は不要である。

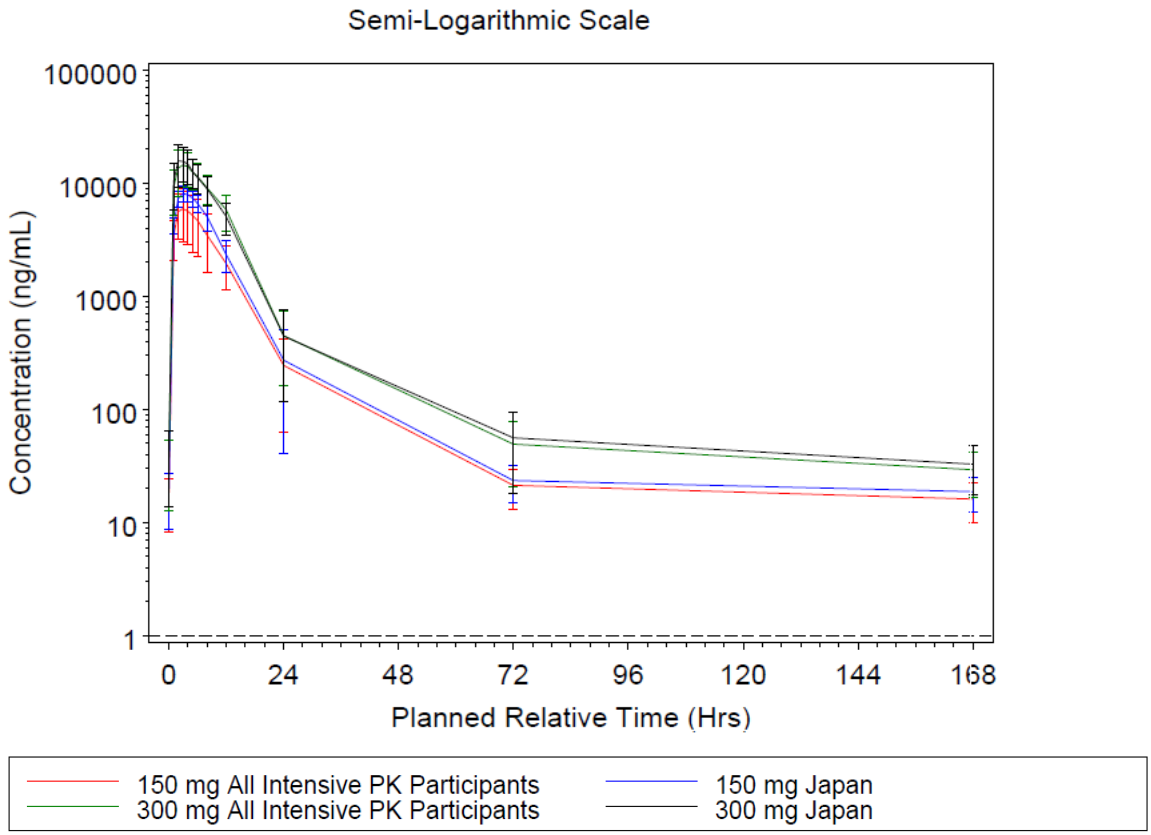
3.3.4. 人種及び民族

日本人被験者

B-Clear 試験の On-NA コホートにおける HBV 持続感染患者の全体集団 24 例（日本人集団 12 例を含む）から PK 評価用検体を経時的に採取した。ベピロビルセン濃度-時間推移を図 5 に示す。また、NCA 法を用いて PK パラメータを算出した。全体集団及び日本人集団のベピロビルセンの AUC(0-24)、AUC(0-tau)、Cmax 及び tmax をそれぞれ m5.3.5.1, B-Clear 試験 CSR Table 75 及び表 6 に示す。

全体集団（Section 2.2.2.2）と日本人集団の PK について、顕著な差は認められなかった。

図 5 Arithmetic Mean (+/-SD) Bepirovirsen Plasma Pharmacokinetic (Intensive) Concentration-Time Plots (Semi-log) by Dose Level (150 mg and 300 mg) and Geographic Region (All and Japan Intensive PK Participants in On NA Cohort)



Source: m5.3.5.1, 209668 (B-Clear) CSR. Figure 104.6
Note: LLQ = 1 ng/mL
The 8-hr and 12-hr PK samples were not collected in one participant from Japan (150 mg).

表 6　Summary of Derived Bepirovirsen Plasma Pharmacokinetic Parameters (non-transformed and log-transformed) by Dose Level (150 mg and 300 mg) (Intensive PK Participants from Japan in On NA Cohort)

	AUC(0-24) (hr*µg/mL)	AUC(0-τ) (hr*µg/mL)	Cmax (µg/mL)	tmax (hr)
Bepirovirsen 150 mg weekly (N=6)				
n	6	6	6	6
Mean (SD)	72.919 (10.6552)	79.648 (12.3025)	8.165 (1.2863)	3.375 (0.4868)
Median (Min, Max)	71.636 (58.80, 87.91)	80.513 (62.36, 93.25)	8.635 (5.83, 9.48)	3.117 (3.00, 4.02)
Geo mean (CV% geo mean)	72.270 (14.75)	78.831 (15.98)	8.069 (17.50)	3.347 (13.96)
Bepirovirsen 300 mg weekly (N=6)				
n	6	6	6	6
Mean (SD)	142.126 (38.6052)	155.165 (42.4729)	16.258 (6.2129)	2.853 (0.6573)
Median (Min, Max)	151.229 (66.16, 170.84)	168.295 (72.46, 185.39)	17.200 (5.95, 25.00)	3.008 (2.00, 3.80)
Geo mean (CV% geo mean)	135.931 (37.06)	148.362 (37.09)	14.963 (51.92)	2.787 (24.23)

Source: m5.3.5.1, 209668 (B-Clear) CSR, Table 104.5
The 8-hr and 12-hr PK samples were not collected in one participant from Japan (150 mg).

人種及び民族の影響

PopPK 解析に含めたアジア人、白人及び黒色人種／アフリカ系アメリカ人の割合はそれぞれ 58.4%、32.3%及び 7.4%であり、東アジア部分集団（定義は以下参照）の割合は全体の 39.8%であった。ヒスパニック／ラテン民族の割合は 9.3%であった（m5.3.3.5, PopPK Report Table 2）。

以下に示す分類に従い、人種をカテゴリカル共変量として評価した。

1. 白人、非白人
2. アジア人、非アジア人

解析の結果、人種及び民族は統計学的に有意な共変量ではなかった。

さらに、最終 PopPK モデルから得られた post-hoc PK パラメータを用いたシミュレーションを実施し、各被験者について、ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間皮下投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）した時の定常状態の曝露量［Cmax、AUC(0-tau)及び Ctrough］を推定した。

全体集団及び以下の部分集団について、ベピロビルセンの曝露量の要約を示した。

1. 人種：白人、黒色人種／アフリカ系アメリカ人、アジア人、東アジア人、東南アジア人、中央又は南アジア人
2. 地域：東アジア及び東アジア以外

3. 国：中国、香港、韓国、台湾、インド及び日本

なお、東アジア人部分集団及び東アジア部分集団は以下の通り定義した：

1. 東アジア人部分集団：居住地を問わず、アジア系中国人、アジア系日本人及びアジア系韓国人の被験者
2. 東アジア部分集団：日本、中国、韓国、台湾又は香港で組み入れられ、東アジア系（アジア系中国人、アジア系日本人及びアジア系韓国人）と報告された被験者

ベピロビルセンの曝露量は人種カテゴリー、異なる地域及び国の間で同程度であり、AUC(0-tau)、Cmax 及び Ctrough の平均値の差は<25%であった（表 7）。ベピロビルセンの曝露量のプロットを、国及び地域の部分集団別に図 6 に示す。

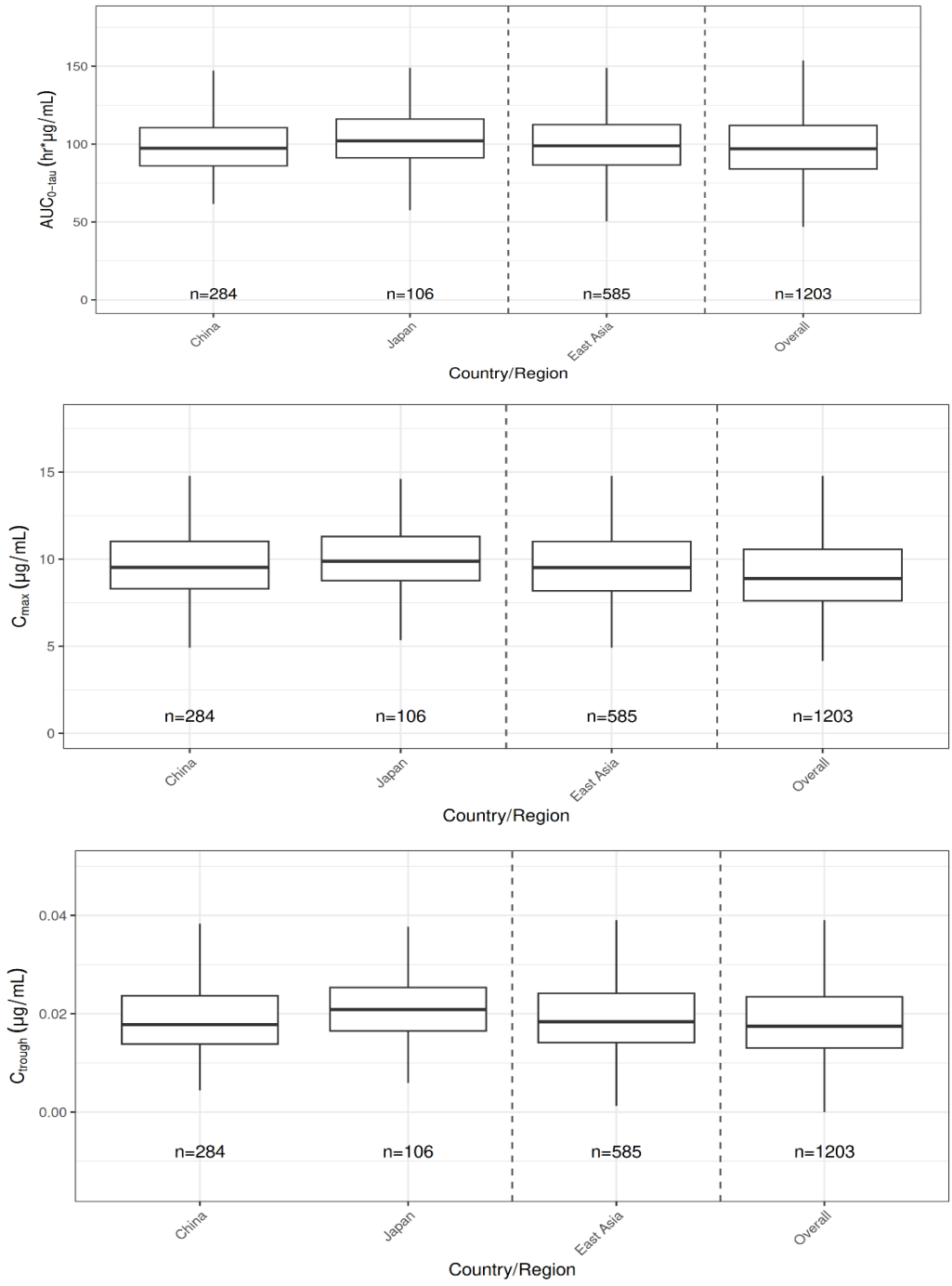
表 7 Summary of Population PK Model-Predicted Steady-State Exposures for Bepirovirsen 300 mg SC Weekly for 24 Weeks by Race/Region/Country in Participants with Chronic HBV Infection

Race / Region / Country	N	Plasma Parameter Mean (SD)		
		AUC(0-tau),ss (µg*hr/mL)	Cmax,ss (µg/mL)	Ctrough,ss (µg/mL)
Race				
Asian	812	103 (30.9)	9.58 (2.14)	0.0222 (0.0381)
East Asian	637	101 (24.5)	9.63 (2.16)	0.0207 (0.0136)
Southeast Asian	109	109 (53.2)	9.50 (1.97)	0.0303 (0.0983)
Central or South Asian	61	112 (35.0)	9.19 (2.25)	0.0229 (0.0112)
Black or African American	56	104 (28.2)	8.06 (1.78)	0.0188 (0.00940)
White	312	97.4 (40.0)	8.28 (2.01)	0.0219 (0.0586)
Region				
East Asia[2]	585	102 (24.8)	9.69 (2.15)	0.0208 (0.0136)
Not-East Asia[1]	618	102 (41.3)	8.61 (2.10)	0.0235 (0.0613)
Country				
China[3]	284	99.9 (19.9)	9.82 (2.17)	0.0196 (0.00883)
Japan	106	108 (28.7)	10.0 (2.20)	0.0236 (0.0157)
Overall	1203	102 (34.3)	9.14 (2.19)	0.0222 (0.0450)

Source: m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report, Table 4.

1. Not-East Asia = this region includes all participants that are resident outside of East Asia (China, Japan, South Korea, Taiwan, Hong Kong).
2. Region of East Asia was defined as participants of East Asian ancestry (Asian-Chinese heritage, Asian-Japanese heritage, Asian-Korean heritage, Asian-East Asian) and enrolled in an East Asian country/area (Japan, China, South Korea, Taiwan, Hong Kong).
3. Country of China = participants enrolled in mainland China and of Chinese ancestry.

図 6　Model-Predicted Steady-State Exposures for Bepirovirsen 300 mg SC Weekly for 24 Weeks by Country/Region in Participants with Chronic HBV Infection (Phase 3 Studies 202009 [B-Well 1] and 219288 [B-Well 2])



Source: m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report, Figure 24.

PK-PD 解析から、人種及び民族は HBs 抗原の治療反応又は血小板数減少の予測因子ではないことが確認された（Section 3.6.1、Section 3.6.3）。

結論：これらのデータから、人種又は民族は HBV 持続感染患者におけるベピロビルセンの PK 又は PK-PD に臨床的に意味のある影響を及ぼさないことが示された。HBV 持続感染患者での人種又は民族に基づく用量調整は不要である。

3.3.5. 性別

PopPK 解析のデータセットに含めた女性の割合は 32.3%であった。性別はベピロビルセンの PK に対する共変量ではなかった（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report Table 2）。また、PK-PD 解析から、性別は HBs 抗原の治療反応又は血小板数減少の予測因子ではないことが確認された（Section 3.6.1、Section 3.6.3）。

結論：HBV 持続感染患者での性別に基づく用量調整は不要である。

3.3.6. 腎機能障害

ベピロビルセンは他の ASO と同様に組織内でエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼにより代謝され、短鎖オリゴヌクレオチドとして尿中排泄される。ベピロビルセンをヒトに 4 週間反復投与した時、24 時間で尿中排泄された未変化体は投与量の<2%であった（m5.3.3.1, 213725 試験 CSR）。

PopPK 解析で、軽度腎機能低下がベピロビルセンの PK に及ぼす影響を評価した。解析に含めた被験者のうち、軽度腎機能低下者（eGFR が 60～90 未満 mL/min/ 1.73 m^2 と定義）は 19.4%であった（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report Table 2）。PopPK 解析の結果、軽度腎機能低下はベピロビルセンの PK に対する共変量ではなかった（Section 3.1.2）。

なお、進行中の第 1 相、非盲検、単回投与試験（B-Kind 試験）では、HBV 持続感染を有さない重度（及び中等度）腎機能低下者のベピロビルセンの PK を健康被験者と比較する予定である。

結論：軽度腎機能障害を有する HBV 持続感染患者での用量調整は不要である。ベースライン時に中等度腎機能低下（3 例）又は重度腎機能低下（0 例）を有する患者（eGFR が 15～60 未満 mL/min/ 1.73 m^2）に関するデータは限られている。

3.3.7. 肝機能障害

B-Assured 試験で、HBV 持続感染を有さない中等度肝機能低下者にベピロビルセン 300 mg を単回投与した時の PK を評価した。中等度肝機能低下者の Cmax、AUC(0-inf)、AUC(0-24)及び AUC(0-168)の幾何平均値は、健康被験者と比較してそれぞれ約 33%、31%、36%及び 32%低かった（Section 2.2.3.1、m5.3.3.3, B-Assured 試験 CSR）。

肝機能障害（Child-Pugh 分類 A、B 又は C）を有する HBV 持続感染患者でのベピロビルセンの PK 及び有効性は評価されていない。

結論：HBV 持続感染を有さない中等度肝機能低下者のベピロビルセンの曝露量は、肝機能が正常な健康被験者と比較して小さかった。肝硬変（Child-Pugh 分類 A、B 又は C）を有する HBV 持続感染患者へのベピロビルセンの投与は禁忌である。

3.4. 外因性要因

3.4.1. 注射部位

各被験者の投与毎の注射部位（上腕部、腹部及び大腿部）を 213725 試験（第 1 相 FTIH 試験）、205695 試験（第 2 相試験）、219239 試験（相対的バイオアベイラビリティ試験）、並びに B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験（いずれも第 3 相試験）で記録した。5 試験の 2003 例中 1416 例（70.7%）から得られた注射部位別の PK データを用いて PopPK 解析で注射部位の影響を共変量として評価した結果、注射部位は曝露量に対する有意な共変量として特定されなかった（m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report）。なお、相対的バイオアベイラビリティ試験の 219239 試験（単回投与試験）の要約は m2.7.1, Section.2.2 に示した。

結論：注射部位はベピロビルセンの PK の予測因子ではなかった。検討したいずれの注射部位でも曝露量に対する重要な影響はなく、ベピロビルセン皮下投与の注射部位を腹部、大腿部又は上腕部とすることが支持された。

3.5. 臨床薬力学

3.5.1. 治療効果に関連する特性

作用機序：ベピロビルセンはキメラ型 2'-MOE 修飾ホスホロチオエート ASO 抗ウイルス薬であり、全種類の HBV mRNA 及びプレゲノム RNA に存在する、高度に保存された 20 ヌクレオチドの配列を標的とする[Billioud, 2016]。ベピロビルセンの結合部位は表面抗原（pre-S1、pre-S2、S）をコードする配列の下流、並びにポリメラーゼ及び X 蛋白質をコードする配列内に存在する。

ベピロビルセンが HBV mRNA にハイブリダイゼーション（結合）すると、RNase H を介した mRNA の分解が誘導され、それによって mRNA から翻訳される蛋白質の産生が阻害される。また、プレゲノム RNA の阻害及びウイルス蛋白質量の低下により、HBV DNA 量が低下する[Yuen, 2021; Yuen, 2022]。ベピロビルセンは、その抗ウイルス作用に加えて、自然免疫刺激作用を有し、これが治療効果に寄与している可能性がある[Singh, 2021; You, 2022]（m2.7.2.4, Section 4.4.B）。

HBs 抗原への影響：ベピロビルセンは HBV RNA 量を低下させることで薬理効果を発揮し、最終的に HBs 抗原量の低下をもたらす。第 2 相及び第 3 相試験の臨床データから、ベピロビルセンが HBV 持続感染患者の HBs 抗原量を著しく低下させることが示された。HBs 抗原量の経時変化を表現し、治療反応の予測因子を特定するために構築された PopPK-HBs 抗原モデルについて Section 3.6.1 に示す。

HBV DNA への影響：B-Clear 試験で、ベースラインの HBV DNA 量が定量可能であった NA 治療を受けていない被験者では、ベピロビルセン投与終了後 24 週時点でも、ベピロビルセンによる HBV DNA の抑制効果が持続することが示された。一方で、NA 治療を受けている被験者では、ほぼ全被験者でベースライン及び試験期間中の HBV DNA 量が<LLOQ であった。NA 治療を受けていない被験者でのベピロビルセンの PK と HBV DNA 量の潜在的な関係について視覚的に評価したが、ベピロビルセン投与終了時の PK と HBV DNA 量に明確な関係は認められなかった。このため、HBV DNA 量とベピロビルセンの PK の関係につ

いて、PK-PD モデルを用いた更なる評価は実施しなかった（m5.3.4.2, Ph2 PopPK-PD Report [TMF-14928609] Section 5.3.5）。

3.6. 用量又は濃度-反応関係

3.6.1. PopPK-HBs 抗原解析

第 2 及び第 3 相試験におけるベピロビルセンの PK と HBs 抗原量の関係を示すことを目的に、mechanistic PK-PD モデルを構築した。本モデルの構築には HBV 持続感染患者を対象とした 4 試験（第 2 相 205695 試験、第 2b 相 B-Clear 試験、並びに第 3 相 B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験）の統合データを用いた。なお、本モデルは B-Clear 試験完了後に開発した PopPK-HBs 抗原-ALT モデルから ALT を記述する構造を除いたモデルである。PopPK-HBs 抗原解析には、2052 例から得られた 69304 件の血清中 HBs 抗原量データが含まれた。全 HBs 抗原量データのうち 17638（25.5%）のデータが<LOD であり、解析には M3 法を用いた [Beal, 2001]。

第 2 相試験のデータを用いて開発した PopPK-HBs 抗原モデルでは、[redacted]が[redacted]として特定された。[redacted]が[redacted]共変量であった。[redacted]、臨床的に意味のあるものであった。[redacted]であったが、臨床的に意味のある共変量とは考えられなかった。本モデル及びモデルパラメータに関する詳細を m5.3.4.2, Ph2 PopPK-PD Report Section 5.3.1 及び Section 5.4.2 に示す。

モデル構築には、最終 PopPK モデルから得られた個々の被験者の post-hoc PK パラメータを用いた。構築した PopPK-HBs 抗原モデルは、[redacted]モデルで表現した。また、第 2 相 PK-HBs 抗原解析において、[redacted]を推定し、第 3 相 PK-HBs 抗原モデルに利用した。[redacted]した。

第 2 相 PK-HBs 抗原解析の結果を確認し、追加の共変量をスクリーニングするため、第 3 相試験のデータを用いて第 2 相 PK-HBs 抗原モデルを更新した。第 3 相試験の登録及び対象患者集団を反映するため、ベースラインの HBs 抗原量>3000 IU/mL の被験者を第 3 相 PopPK-HBs 抗原解析から除外した。本モデルの構築及びバリデーションについての更なる詳細を m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report Section 5.4.1 及び Section 6.2.2 に示す。

第 3 相 PK-HBs 抗原解析では、第 2 相 PK-HBs 抗原モデルの基本的な構造が維持された。[redacted]

[redacted]、追加のパラメータ（[redacted]）をモデルに含めた。[redacted]した。第 3 相試験では、第 2 相試験と比較して休薬期間が長かったことから[redacted]は明らかであり、[redacted]。[redacted]。[redacted]（m5.3.4.2, Ph3 PK-PD Report Section 5.4.1）。

臨床的に注目すべき共変量として、[redacted]を共変量スクリーニングに含めた（m5.3.4.2, Ph3 PK-PD Report Section 5.4.2）。

最終 PopPK-HBs 抗原モデルには、[redacted]、並びに推定した[redacted]の影響を含めた。PopPK-HBs 抗原モデルのパラメータ推定値及び関連する個体間変動を表 18 に示す。

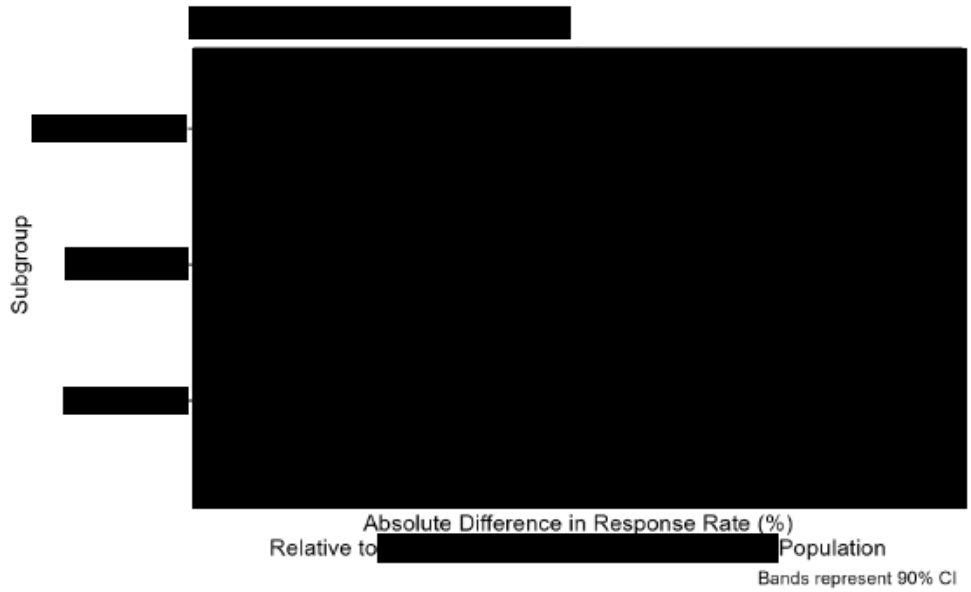
ベピロビルセンでは、全 HBV genotype 群で標準治療に比べて Week 72 で高い治療反応を示すことが示唆された。[redacted]の影響を最小限に抑えながら、ベースラインの HBV genotype の影響を推定するため、[redacted]別に[redacted]の HBs 抗原反応に対する影響をそれぞれ評価した。[redacted]の Week 72 の HBs 抗原反応率は、[redacted]の全部分集団と比較し、それぞれ[redacted]%及び[redacted]%[redacted]と予測された。[redacted]は、[redacted]の部分集団では Week 72 の治療反応率との関連性は認められなかったが、[redacted]の部分集団では Week 72 の治療反応率が全部分集団と比較し[redacted]%[redacted]すると予測された（図 7、m5.3.4.2, Ph3 PK-PD Report Section 6.2.6.2）。

共変量別の HBs 抗原反応並びにその他の注目すべき人口統計学的特性及びベースライン特性

PopPK-HBs 抗原モデルに基づくシミュレーションにより、ベースライン HBs 抗原量、HBV genotype、体重四分位数、人種及び国別におけるベピロビルセンに対する反応を予測した（m5.3.4.2, Ph3 PK-PD Report Section 5.5.3.3）。

図 7　HBsAg Response (Percentage <LOD) through Week 72 (24 weeks after discontinuation of chronic HBV treatment) for Bepirovirsen 300 mg weekly for 24 weeks, based on Post-hoc PK and PD Estimates in Phase 3 Subpopulations





Source: m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report, Figure 12 and Figure 13
Upper panel: overall participants; middle panel:
Other genotypes:
HBsAg units = IU/mL

Week 72 の HBs 抗原反応率の予測値は、 。Week 72 で予測される HBs 抗原反応の人種及び国によるばらつきは、 、 、 などの複数の因子の寄与を反映していると考えられた（表 8）。

表 8 Summary of Model-Predicted Mean HBsAg Response at Bepirovirsen End of Treatment and End of Study

Covariate	Percentage of Participants with HBsAg Level <LOD Mean (90% CI)		
	N	End of Bepirovirsen Treatment (Week 24)	24 weeks after discontinuation of chronic HBV treatment (Week 72)

Covariate	Percentage of Participants with HBsAg Level <LOD Mean (90% CI)		
	N	End of Bepirovirsen Treatment (Week 24)	24 weeks after discontinuation of chronic HBV treatment (Week 72)
[redacted]			

Source: m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report, Table 5
LOD = limit of detection; N = mean number or participants for 100 simulations
[redacted]
Dosing regimen: QW for 24 weeks with loading doses on Days 4 and 11
Week 24: end of treatment; Week 72: end of study
[redacted]

治療アドヒアランスが HBs 抗原反応に及ぼす影響

24 週間の投与期間中のいずれかの時点でベピロビルセンの投与を 1 回、2 回又は 3 回行わなかった場合を想定したシナリオをシミュレーションすることにより、治療アドヒアランスが HBs 抗原反応に及ぼす影響を評価した。投与終了時に奏効（Week 24 で HBs 抗原量が <LOD）を達成する被験者の予測割合を要約し、投与欠損によるベピロビルセンの曝露量の減少が奏効率に及ぼす影響を評価した。24 週間のベピロビルセン投与期間中における 1～3 回の非連続的な投与欠損は、投与終了時（Week 24）の HBs 抗原反応（<LOD）に有意な影響を及ぼさないと予測された（表 9）。

表 9　Summary of Model-Predicted HBsAg Response for Bepirovirsen 300 mg SC Weekly for 24 Weeks by Varying Treatment Adherence

Treatment Adherence Scenario	N	Percentage of Participants with HBsAg Level <LOD Mean (90% CI)
		End of Bepirovirsen Treatment (Week 24)
No missed doses (100% adherence)	600	[redacted]
Missed 1 dose at any time	600	
Missed 2 doses at any time	600	
Missed 3 doses at any time	600	

Source: m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report, Table 6
N = mean number or participants for 100 simulations

早期の治療反応と FC の関係に基づく PK-HBs 抗原モデルによる予測

第 3 相試験（B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験）のデータを用いて、ベースラインの HBs 抗原量及び投与開始後早期のベピロビルセン投与に対する HBs 抗原反応の欠如に基づき、FC を達成する可能性が極めて低い被験者を特定した（m2.7.3）。[redacted] の被験者では [redacted]

[redacted]の被験者では[redacted]。

上記の定義に基づき分類した早期の治療反応あり又はなしの被験者の平均割合、及び Week 72 に HBs 抗原量<LOD となった被験者の平均割合を、シミュレーションにより予測した。シミュレーション結果は、ベースラインの HBs 抗原量カテゴリー及び HBV genotype 別に示した（表 10）。

表 10 Summary of Model-Predicted HBsAg Response at Week 72 for Bepirovirsen 300 mg SC Weekly for 24 Weeks [redacted]

Baseline HBsAg Category On-treatment HBsAg Level	Population	Early treatment Response Group	Mean Percentage of Participants in Each Early Treatment Response Group	Mean Percentage of Participants Achieving FC Within Each Early Treatment Response Group[a]
Baseline HBsAg ≤1000 IU/mL	[redacted] (N=363)	[redacted]		
HBsAg level [redacted]	[redacted] (N=34)			
	[redacted] (N=112)			
	[redacted] (N=217)			
Baseline HBsAg >1000 IU/mL	[redacted] (N=237)			
HBsAg level [redacted]	[redacted] (N=27)			
	[redacted] (N=74)			
	[redacted] (N=136)			

Source: m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report, Table 7.
Population N = mean number of participants for 100 simulations
[redacted]

a. The predicted FC % is based on completing the 24-week treatment regimen for both groups.

結論：PK-HBs 抗原モデル解析の結果、[redacted]。[redacted]。[redacted]。[redacted]。

[redacted]。

以上より、患者特性又は疾患特性に基づく用量調整は不要である。

3.6.2. PopPK-HBs 抗原-ALT 解析

臨床試験では、ベピロビルセン投与後に HBs 抗原量が低下した後、又は低下したと同時に、一過性の ALT 増加が認められた。ベピロビルセンの作用機序から、ALT 増加と HBs 抗原量低下の同時発現には関連性があると考えられる。HBs 抗原は、抗ウイルス自然免疫応答の抑制、及び獲得免疫の機能障害を引き起こす複数のメカニズムを介して免疫抑制に関与している（m2.5、Section 1.2）。ベピロビルセンによる HBs 抗原合成の阻害により、全身の HBs 抗原量が低下し免疫応答が回復することで、免疫による感染肝細胞の排除が促進され、結果として ALT が全身循環へ放出されると考えられえる。

第 2 相試験（205695 試験及び B-Clear 試験）のデータを用いて、個々の被験者における PK 及び HBs 抗原の post-hoc パラメータ及び ALT のデータから、PopPK-HBs 抗原-ALT モデルを構築した。PopPK-HBs 抗原-ALT モデルの ALT に関する部分には、[redacted]を適用した[Li, 2021]。この ALT 放出を記述する一般的なモデルに、[redacted]（m5.3.4.2, Ph2 PopPK-PD Report Section 4.5.2, Section 5.3.2）。第 2 相試験のデータを用いて構築した PopPK-HBs 抗原-ALT モデル構造を図 8 に示す。

図 8 Bepirovirsen PK-HBsAg-ALT Model Schematic

[redacted]

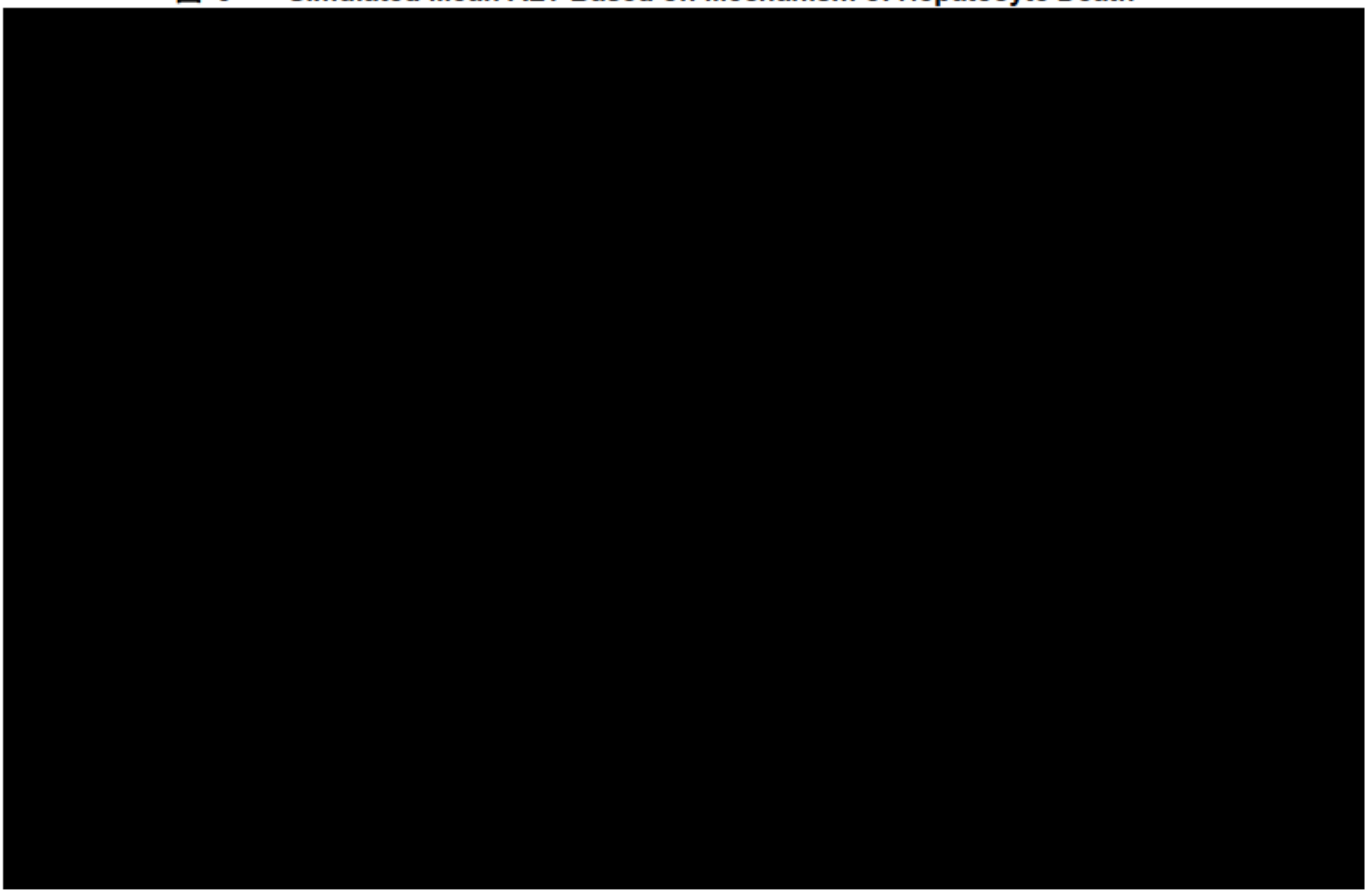


モデル及びモデルパラメータに関する更なる詳細を m5.3.4.2, Ph2 PopPK-PD Report Section 5.4 に示す。

第 2 相試験の結果及びそれに基づく第 2 相 PopPK-PD モデルの結果から、ベピロビルセン投与後に認められた一過性の ALT 増加は、主に HBs 抗原抑制後の、免疫による感染肝細胞の排除によって引き起こされ、ベピロビルセンによる直接的な肝細胞死の誘導によるものではないと考えられた（m5.3.4.2, Ph2 PopPK-PD Report Section6.2）。この予測を裏付ける結果を以下に示す。

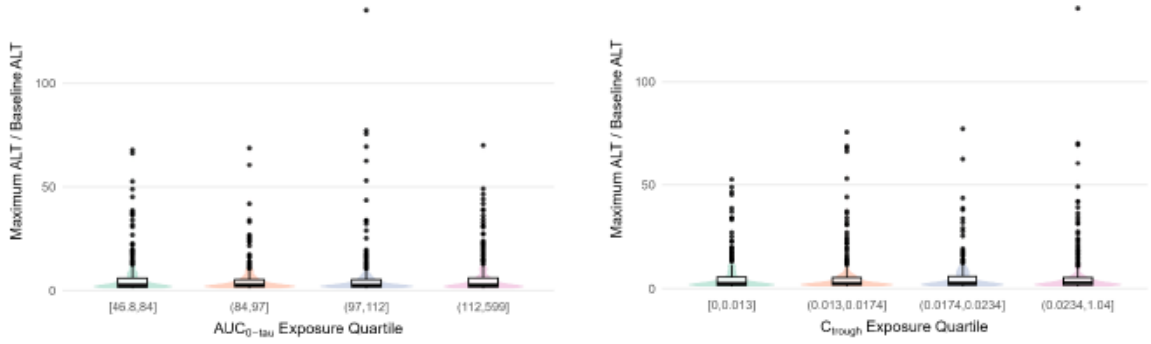
1. ALT 増加は、主に HBs 抗原量低下の開始と並行して、又はその直後に認められた。また、ベピロビルセン投与中に HBs 抗原量の低下は持続したが、ALT はベースラインの値に戻った。
2. ベピロビルセン 300 mg の週 1 回投与に加えて負荷投与を実施した被験者では、負荷投与を実施しなかった被験者（ベピロビルセン 300 mg の週 1 回投与のみを実施）と比較して、最初の 4 週間のベピロビルセンの曝露量が大きかったにも関わらず、ALT 増加の程度は同程度であった。これらのデータは、ベピロビルセンの曝露量又は肝細胞への直接的な影響以外の要因により、ALT 増加が引き起こされることを示唆するものである。
3. PopPK-HBs 抗原-ALT モデルから推定された、[redacted]は、[redacted]と比較して、顕著に高かった。
4. モデルに基づくシミュレーションから、ベピロビルセンの直接的な肝細胞への影響のみを考慮したモデルと比較して、HBs 抗原抑制のフィードバック機構、又は直接的及び間接的（HBs 抗原量低下）作用を考慮したモデルで、ALT 増加の程度が高く予測されることが示された（図 9）。

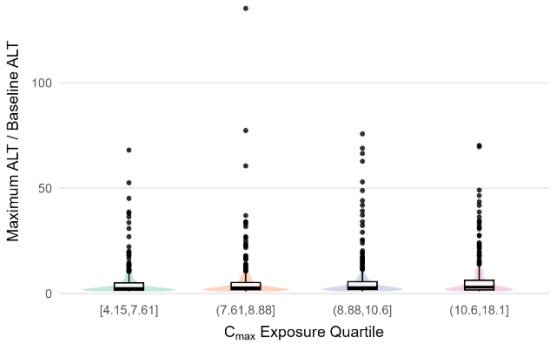
図 9　Simulated Mean ALT Based on Mechanism of Hepatocyte Death



PopPK-HBs 抗原-ALT モデルの構造の複雑さ及びそれに伴う不安定性、並びにモデルの実行時間の長さを考慮して、第 3 相試験のデータを用いて第 2 相試験に基づくモデルを改良した（PopPK-HBs 抗原モデル、Section 3.6.1）。第 3 相試験のデータを用いて作成された PK-ALT の探索的プロットから、ベピロビルセンの曝露量が ALT 増加に関連しないことが確認された（図 10、図 11）。

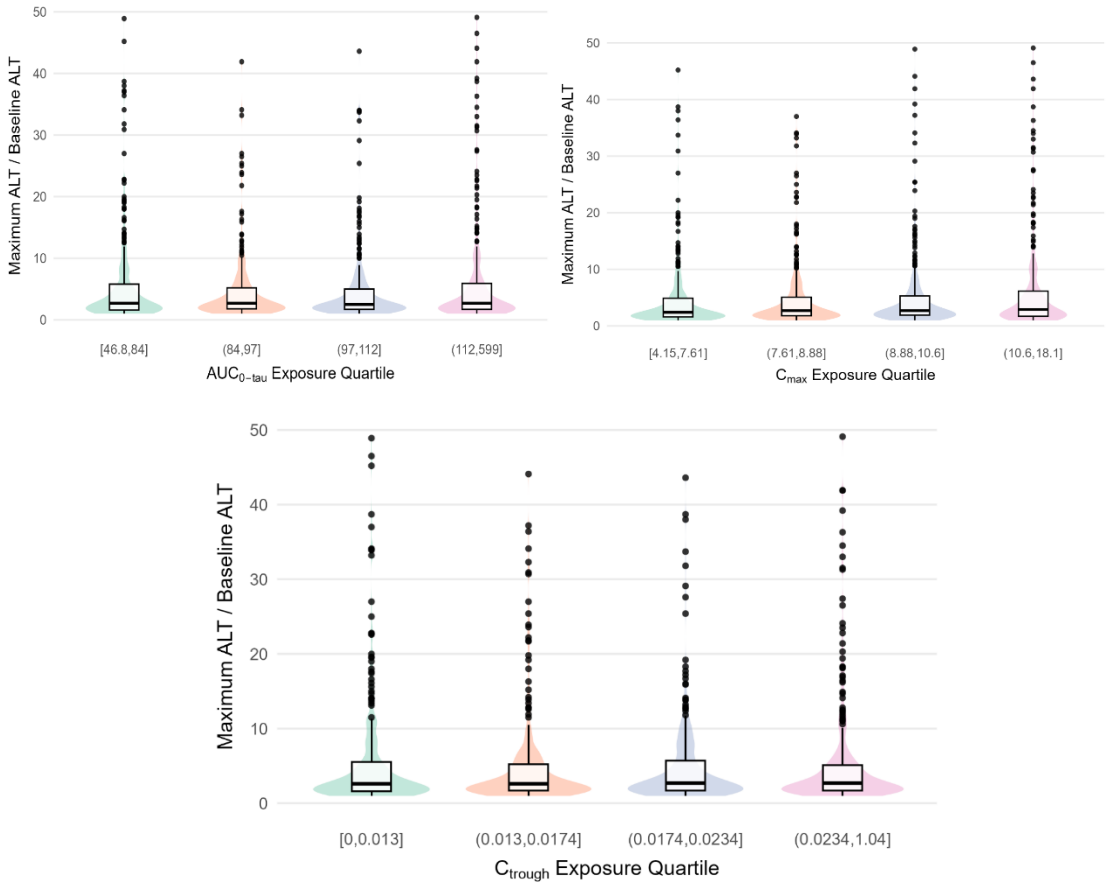
図 10　Exploratory Plot of Post-hoc Bepirovirsen PK Exposure Metrics vs. Maximum Fold Change from Baseline ALT in Phase 3 Studies 202009 (B-Well 1) and 219288 (B-Well 2), All Data





Source: m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report, Figure 21

図 11 Exploratory Plot of Post-hoc Bepirovirsen PK Exposure Metrics vs. Maximum Fold Change from Baseline ALT in Phase 3 Studies 202009 (B-Well 1) and 219288 (B-Well 2), Values >50-fold Removed for Visualization



Source: m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report, Figure 22

3.6.3. PopPK-血小板解析

血小板数は、ベピロビルセン投与後に経時的に減少し、ベピロビルセン投与中止後にベースライン値に回復した。臨床試験で認められた血小板数の経時推移の特性を評価するため、PopPK-血小板モデルを構築した。文献で公開されている[redacted]を記述するモデル[redacted]を適用し、[redacted]、[redacted]、[redacted]、及び[redacted]でのベースラインからの変化に応じて[redacted]で構成した。モデルには、[redacted]ベピロビルセンの[redacted]を含めた。モデリングの方法に関する詳細を m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report Section 5.4.3 に示す。PopPK-血小板モデルの構造を図 12 に示す。

図 12 Bepirovirsen PK-Platelet Model Schematic

[redacted]

Source: [redacted] ([redacted]).
γ = feedback parameter; CircP = circulating platelets at time t; CircP0 = circulating platelets at baseline; kel = elimination rate constant; ksyn = synthesis rate constant; ktr = transit rate constant; MTT = mean transit time; Prol= platelet proliferation pool; Rbd = feedback effect of circulating platelets on platelet production; T = maturation compartments

[redacted]η-共変量プロットを用いてスクリーニングした。最終モデルにおいて[redacted]であった（m5.3.4.2, Ph3 PK-PD Report Section 5.4.4, Section 6.3.3）。

本モデルのパラメータ推定値を表 19 に示す。ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施、投与中断を伴わない）終了時の Grade 1～4 の血小板減少症の発現割合は、それぞれ[redacted]%、[redacted]%、[redacted]%及び[redacted]%と予測された（表 11）。[redacted]の血小板減少症の平均持続期間は[redacted]と予測された。血小板減少症の発現に伴い投与を中断することにより、血小板減少症の持続期間が短縮し、Grade 3 及び Grade 4 の血小板減少症の発現頻度が減少すると予想される。[redacted]の被験者では[redacted]と予測されたが、主に[redacted]であり、[redacted]であった。（m5.3.4.2, Ph3 PK-PD Report

Section 6.3.6.1）。また、[redacted]、[redacted]であると予測された（表 11）。

表 11　Summary of Model-Predicted Percentage of Participants with Thrombocytopenia without Dose Interruption

Population	End of Bepirovirsen Treatment (Week 24)				End of NA consolidation period (Week 48)				24 weeks after discontinuation of chronic HBV treatment (Week 72)			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Overall (N = 600)	[redacted]											
Body Weight Quartiles												
Q1: 39.1 to 61.9 kg (N = 150)	[redacted]											
Q2: 61.9 to 71.3 kg (N = 150)	[redacted]											
Q3: 71.3 to 80.9 kg (N = 150)	[redacted]											
Q4: 80.9 to 131 kg (N = 150)	[redacted]											
ADA												
Negative (N = 600)	[redacted]											
Positive (N = 600)	[redacted]											

Source: m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report, Table 10
N = The mean number of participants for 100 simulations
Thrombocytopenia Grade 1 = 100 to <125 x 10^9/L; Grade 2 = 50 to <100 x 10^9/L; Grade 3 = 25 to <50 x 10^9/L; Grade 4 = <25 x 10^9/L (based on DAIDS v2.1 criteria [DAIDS, 2017])
ADA positive from Week 18

3.6.4.　QTc への影響

血漿中ベピロビルセン濃度と ΔΔQTcF の関係を評価するため、205873 試験のデータを用いた曝露-反応解析を実施した。臨床用量よりも高用量のベピロビルセン（450 mg 及び 600 mg）を単回投与後、臨床的に重要な QTcF 延長は認められなかった。

205873 試験の結果及び関連する曝露-反応解析を Section 2.4.2 に示し、非臨床試験から得られた結果を Section 2.4.1 に示す。

3.7.　用量調整

本申請におけるベピロビルセンの用法・用量（案）の根拠を以下に示す。

- B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験の FC 達成割合は、ベースラインの HBs 抗原量 ≤3000 IU/mL の被験者でそれぞれ 20%及び 19%、≤1000 IU/mL の被験者でそれぞれ 25%及び 28%であった。
- ベピロビルセン投与終了時に HBs 抗原が検出されず HBV DNA <LLOQ であった被験者の割合は、B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験でそれぞれ 45%及び 42%（≤3000 IU/mL）、54%及び 49%（≤1000 IU/mL）であった。
- PopPK-PD モデルに基づくシミュレーションは、本申請における用法・用量（案）をサポートした。更に、シミュレーションにより用量の適切性が確認された。
- 体重及び ADA の有無はベピロビルセンの PK に対する統計学的に有意な共変量であった。[redacted]。
- 人種及び民族は、HBV 持続感染患者でのベピロビルセンの PK 又は PD に影響を及ぼさないことが確認された。
- [redacted]、[redacted] は、PopPK-HBs 抗原モデルの [redacted]であるが、それに伴う HBs 抗原反応の変化に基づく用量調節は不要であることが示された。
- 共変量の評価から、ADA の有無、年齢、性別、軽度腎機能低下、HBe 抗原の有無、又は NA を含む併用薬投与に基づく用量調整は不要であることが確認された。
- 全体として、PopPK 及び PK-PD 解析の結果から、患者特性又は疾患特性に基づくベピロビルセンの用量調整は不要であることが示された。

4.A 特別な試験

4.1.A 免疫原性

臨床開発を通じてベピロビルセンの免疫原性を評価した。詳細については m5.3.5.3（免疫原性に関する統合概要）及び個々の試験の CSR に示す。PopPK 及び PopPK-PD 解析における ADA の評価は Section 3.3.3 に示す。

免疫原性を、219239 試験、B-Assured 試験、B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験の 4 試験で評価した。

ADA の評価には、バリデーションされた段階的アッセイを用いた。このアッセイでは、ELISA 法で検体を解析し、ADA を検出した（m2.7.1, Section 1.3.1.2）。

4.1.1.A 219239 試験（相対的バイオアベイラビリティ試験）

ベースラインで ADA 陽性であった被験者は 159 例中 2 例（1%）であった。ベピロビルセン投与後に ADA が陽性であった被験者は 159 例中 11 例（7%）であった。ベピロビルセン投与後に ADA が認められた被験者は少なく、投与群間で同程度であった（m5.3.1.2, 219239 試験 CSR Section 5.4）。

4.1.2.A　B-Assured 試験

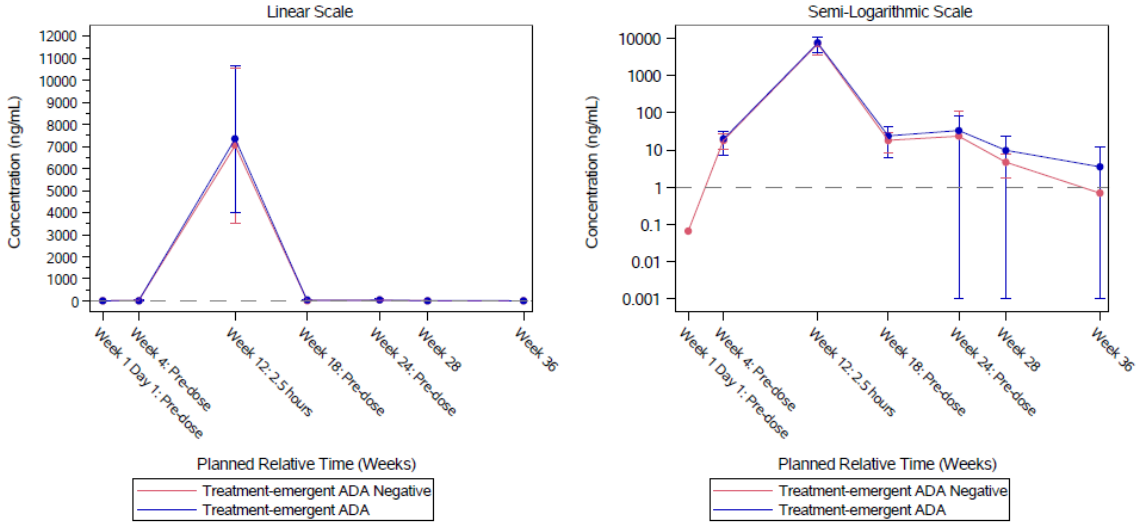
ベースラインで ADA 陽性であった被験者は 24 例中 2 例（8%）であった。このうち 1 例は対照となる健康被験者であり、本被験者はベピロビルセン投与開始後の規定来院で抗体価が上昇した。本被験者は treatment-boosted ADA（ベースラインで ADA 陽性で、ベースライン後に抗体価がベースラインの値の>4 倍に上昇した被験者）に該当すると考えられた。もう 1 例は中等度肝機能低下者であり、ベピロビルセン投与開始後の規定来院で抗体価の上昇が認められず、ベピロビルセン投与と関連のない ADA 陽性と考えられた。また、ベピロビルセン投与後に ADA 陽性となり、treatment-induced ADA（ベースラインで ADA 陰性で、ベースライン後に陽性となった被験者）に該当すると考えられる被験者が 1 例認められた。ベピロビルセン投与後に ADA が認められた被験者（treatment-boosted ADA 及び treatment-induced ADA）は、24 例中 2 例（8%）であった。ADA 陽性被験者に、PK への明らかな影響は認められなかった（m5.3.3.3, B-Assured 試験 CSR Section 8）。

4.1.3.A　B-Well 1 試験

ベースラインで ADA 陽性であった被験者は、ベピロビルセン投与 646 例中 11 例（2%）であった。ベピロビルセンを 24 週間投与された被験者のうち、ベピロビルセン投与後に ADA が認められた被験者は 642 例中 267 例（42%）であり、このうち 265 例（41%）が treatment-induced ADA であった。Treatment-induced ADA が認められた被験者の最大抗体価の中央値（範囲）は 400.0（25～51200）であり、Treatment-induced ADA が認められた被験者のうち ADA 発現が持続性及び一過性であった被験者は、それぞれ 642 例中 241 例（38%）及び 24 例（4%）であった（m5.3.5.1, B-Well 1 CSR Section 5.4）。

ADA 陽性被験者のベピロビルセン血漿中濃度は、ADA 陰性被験者と比較して 24 週間の投与期間全体を通じて同程度であり、投与終了後は高かった（図 13）。PopPK 解析による追加の評価を Section 3.3.3 に示す。

図 13　Mean (+/- SD) plot for ADA impact on PK profiles in B-Well 1



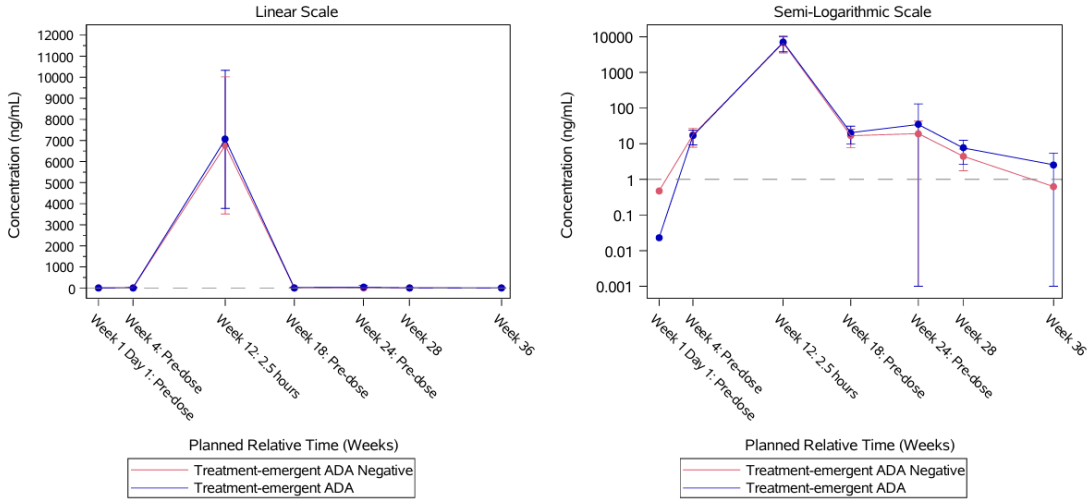
Source: m5.3.5.1, B-Well 1 CSR, Figure 4.08

4.1.4.A　B-Well 2 試験

ベースラインで ADA 陽性であった被験者は、ベピロビルセン投与例 568 例中 3 例（<1%）であった。ベピロビルセンを 24 週間投与された被験者のうち、ベピロビルセン投与後に ADA が認められた被験者は 561 例中 250 例（45%）であり、このうち 249 例（44%）が treatment-induced ADA であった。Treatment-induced ADA が認められた被験者の最大抗体価の中央値（範囲）は 400.0（25～25600）であり、Treatment-induced ADA が認められた被験者のうち ADA 発現が持続性及び一過性であった被験者は、それぞれ 561 例中 244 例（43%）及び 5 例（<1%）であった（m5.3.5.1, B-Well 2 CSR Section 5.4）。

ADA 陽性被験者のベピロビルセン血漿中濃度は、ADA 陰性被験者と比較して 24 週間の投与期間全体を通じて同程度であり、投与終了後は高かった（図 14）。PopPK 解析による追加の評価を Section 3.3.3 に示す。

図 14　Mean (+/- SD) plot for ADA impact on PK profiles in B-Well 2



Source: m5.3.5.1, B-Well 2 CSR, Figure 4.08

4.1.5.A　第 3 相 PopPK 解析及び PopPK-PD 解析による ADA の影響の評価

PopPK 解析により、ADA がベピロビルセンの PK に及ぼす影響を評価した（Section 3.3.3）。

なお、ADA がベピロビルセンの有効性及び安全性に及ぼす影響についての考察は、Section 3.3.3、m2.7.3 及び m2.7.4、並びに m5.3.5.3 に示す。ADA の有無による曝露量の差はベピロビルセンの PK 及び有効性に臨床的に意味のある影響を及ぼさず、有害事象の発現割合及び重症度、又は他の安全性に関する結果との関連性は認められなかった。

参考文献一覧 A

Beal SL. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. J Pharmacokinet Pharmacodyn. October 2001;28(5):481-504.

Billioud G, Kruse RL, Carrillo M, et al. In vivo reduction of hepatitis B virus antigenemia and viremia by antisense oligonucleotides. J Hepatol. 2016;64(4):781-9.

Chan P, Mould DR, Tarif MA, et al. Using Population Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analyses of Entecavir in Pediatric Subjects to Simplify Dosing Recommendations. Clin Pharmacokinet. 2016;55(12):1559-72.

Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res. July 1993;10(7):1093-5.

Food and Drug Administration (FDA) Guidance for Industry: Pharmacokinetics in Patients with Impaired Hepatic Function: Study Design, Data Analysis, and Impact on Dosing and Labeling. Clinical Pharmacology. May 2003.

Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Chronic Hepatitis B Virus Infection: Developing Drug for Treatment. April 2022.

Friberg LE, Henningsson A, Maas H, et al. Model of chemotherapy-induced myelosuppression with parameter consistency across drugs. J Clin Oncol. December 2002;20(24):4713-21.

Geary RS, Norris D, Yu R, et al. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. Adv Drug Deliv Rev. 2015;87:46-51.

Grudzinska-Goebel J, Braun M, Chen LZ, et al. Immunogenicity Risk Assessment for Nucleic Acid Therapeutics: A Comprehensive Evaluation for ASO, siRNA, and Nonvaccine mRNA/LNP Therapies by the IQ Consortium. Nucleic Acid Ther. 2025;35(6):261-279.

ICH Harmonized Guideline. Drug interaction Studes (M12). May 2024.

ICH Harmonized Guideline. Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3(R2). June 2009.

Jullien V, Tréluyer JM, Rey E, et al. Population pharmacokinetics of tenofovir in human immunodeficiency virus-infected patients taking highly active antiretroviral therapy. Antimicrob Agents Chemother. August 2005;49(8):3361-6.

Li J, Karlsson MO, Sanhajariya S, et al. A general model for cell death and biomarker release from injured tissues. J Pharmacokinet Pharmacodyn. February 2021;48(1):69-82.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Division of AIDS (DAIDS) Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events, Version 2.1, July 2017.

Post N, Yu R, Greenlee S, et al. Metabolism and Disposition of Volanesorsen, a 2'-O-(2 methoxyethyl) Antisense Oligonucleotide, Across Species. Drug Metab Dispos. 2019.47(10), 1164–73.

Singh J, You S, Jordan W, et al. Treatment with bepirovirsen leads to hepatitis B surface antigen (HBsAg) reduction and cytokine/chemokine responses linked to innate and adaptive immunity in a Phase 2a, randomized, double-blind, placebo-controlled study. Hepatology. 2021;74:157-1288.

Soto E, Banfield C, Gupta P, et al. Kinetic-Pharmacodynamic Model of Platelet Time Course in Patients with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis Treated with Oral Janus Kinase 1 Inhibitor Abrocitinib. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol. 2020;9(10):553-60.

Thimme R, Bertoletti A, Iannacone M. Beyond exhaustion: the unique characteristics of CD8(+) T cell dysfunction in chronic HBV infection. Nat Rev Immunol. 2024;24(11):775-6.

You S, Delahaye J, Ermler M, et al. Bepirovirsen, antisense oligonucleotide (ASO) against hepatitis B virus (HBV), harbors intrinsic immunostimulatory activity via toll-like receptor 8 (TLR8)

preclinically, correlating with clinical efficacy from the Phase 2a study. Journal of Hepatology. 2022;77:S873-S4.

Yu RZ, Kim TW, Hong A, et al. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B 100. Drug Metab Dispos. 2007;35:460-8.

Yu RZ, Warren MS, Watanabe T, et al. Lack of interactions between an antisense oligonucleotide with 2'-O-(2-methoxyethyl) modifications and major drug transporters. Nucleic Acid Ther 2016;26 (2):111-17.

Yuen MF, Heo J, Jang JW, et al. Safety, tolerability and antiviral activity of the antisense oligonucleotide bepirovirsen in patients with chronic hepatitis B: a phase 2 randomized controlled trial. Nat Med. 2021;27(10):1725-34.

Yuen MF, Lim SG, Plesniak R, et al. Efficacy and Safety of Bepirovirsen in Chronic Hepatitis B Infection. N Engl J Med. 2022;387(21):1957-68.

Zhu M, Bifano M, Xu X, et.al. Lack of an effect of human immunodeficiency virus coinfection on the pharmacokinetics of entecavir in hepatitis B virus-infected patients. Antimicrob Agents Chemother. August 2008;52(8):2836-41.

5.A 付録

表 12 Tabular Listing of All Clinical Pharmacology Studies

Study Identifier **Study Status;** **Study Phase** **Study Report Location;**	**Study Design**	**Clinical Pharmacology Aspect Characterized**	**Healthy Participants or Diagnosis of Patients**	**No. of Participants enrolled/completed** **Sex M/F** **Mean Age (SD)**
FTIH study (213725) Completed Phase 1 m5.3.3.1	Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Rising dose	• Characterize single dose and repeat dose (4 weeks) plasma PK profiles of bepirovirsen in healthy participants • Quantify the percent of dose excreted unchanged in urine	Healthy Participants	Active: 16 enrolled/16 completed 14M/2F 47.9 years (11.7) Placebo 12 enrolled/12 completed 8M/4F 51.1 years (9.8)
Phase 2 Study (205695) Completed Phase 2 m5.3.4.2	Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Rising dose	• Characterize single dose and repeat dose (4 weeks) plasma PK profiles of bepirovirsen in participants with chronic HBV infection • Dose proportionality and Accumulation • Assessment of the effect of NA on bepirovirsen PK	Cohort 1 to Cohort 3: Treatment-naïve patients Cohort 4: Patients on NA regimen	Cohort 1 to Cohort 3: 24 enrolled/ 24 completed 11M/13F 42.6 years (12.89) Cohort 4: 7 enrolled/ 6 completed 5M/2F 48.4 years (7.40)
209668 (B-Clear) Completed Phase 2b m5.3.5.1	Randomized, Placebo-controlled	• Estimate of bepirovirsen t1/2 following cessation of weekly dosing (12 or 24 weeks) in participants with chronic HBV infection	Patients with chronic HBV infection on stable NA treatment	Arm 1: 68 enrolled/ 65 completed 48M/20F 49.0 years (11.54) Arm 2:

Study Identifier **Study Status;** **Study Phase** **Study Report Location;**	**Study Design**	**Clinical Pharmacology Aspect Characterized**	**Healthy Participants or Diagnosis of Patients**	**No. of Participants enrolled/completed** **Sex M/F** **Mean Age (SD)**
		• Characterization of PK profile at steady state (intense PK sampling) and estimate of bepirovirsen tmax • Time to steady-state • Assessment of the DDI potential between bepirovirsen and NA		68 enrolled/ 65 completed 49M/19F 46.1 years (12.60) Arm 3: 68 enrolled/ 66 completed 51M/17F 47.4 years (11.18) Arm 4: 23 enrolled/ 22 completed 17M/6F 49.8 years (11.21)
			Patients with chronic HBV infection Not-on-NA treatment	Arm 1: 70 enrolled/ 64 completed 33M/37F 44.5 years (11.10) Arm 2: 68 enrolled/ 66 completed 41M/27F 43.8 years (9.92) Arm 3: 68 enrolled/ 63 completed 39M/29F 40.7 years (11.10) Arm 4:

Study Identifier **Study Status;** **Study Phase** **Study Report Location;**	**Study Design**	**Clinical Pharmacology Aspect Characterized**	**Healthy Participants or Diagnosis of Patients**	**No. of Participants enrolled/completed** **Sex M/F** **Mean Age (SD)**
				24 enrolled/ 24 completed 11M/13F 42.4 years (12.02)
209348 (B-Together) Completed Phase 2b m5.3.5.1	Randomized, open-label, parallel group	Estimate of bepirovirsen t1/2 following cessation of weekly dosing (dosing was 12 or 24 weeks) in participants with chronic HBV infection	Patients with Chronic HBV infection	Arm 1 55 enrolled/49 completed 44M/11F 45.5 years (10.73) Arm 2 53 enrolled/50 completed 33M/20F 45.5 years (9.35)
212602 (B-Fine) Completed Phase 2a m5.3.5.2	Open-label	• Estimate of bepirovirsen t1/2 following cessation of weekly dosing (12 weeks) in participants with chronic HBV infection • Time to steady-state	HBeAg-negative chronic HBV infection on stable NA therapy	12 enrolled/11 completed 8M/4F 48.8 years (8.48)
205871 (B-Assured) Completed Phase 1 m5.3.3.3	Open-label, non-randomized, PK	Assessment of the impact of moderate hepatic impairment on bepirovirsen PK in participants without chronic HBV infection.	Participants with hepatic impairment and healthy participants	Participants with hepatic impairment 12 enrolled/12 completed 7M/5F 59.9 years (7.10) Healthy participants 12 enrolled/12 completed 7M/5F 60.9 years (8.49)

Study Identifier **Study Status;** **Study Phase** **Study Report Location;**	**Study Design**	**Clinical Pharmacology Aspect Characterized**	**Healthy Participants or Diagnosis of Patients**	**No. of Participants enrolled/completed** **Sex M/F** **Mean Age (SD)**
219239 Completed Phase 1 m5.3.1.2	Open-label, randomized, Parallel group, PK, SC	Relative bioavailability of bepirovirsen following administration via a PFS fitted with an SSD compared to vial Relative bioavailability of bepirovirsen following administration via SSD by HCP compared to self-administration (with or without training)	Healthy participants	Group 1 (Vial by HCP) 46 enrolled/46 completed 20M/ 26F 35.7 years (9.09) Group 2 (PFS SSD by HCP 49 enrolled/49 completed 24M/ 25F 36.5 years (9.57) Group 3 (PFS SSD Self admin post-training) 32 enrolled/30 completed 17M/ 15F 36.6 years (9.35) Group 4 (PFS SSD Self admin without training) 33 enrolled/30 completed 16M/ 16F 37.5 years (9.74)
202009 (B-Well 1) Phase 3 m5.3.5.1	Randomized, Double-blind, Placebo-controlled	Assessment of the impact of ADA and injection site on bepirovirsen PK and PD	NA treated participants with chronic HBV infection	Placebo 328 enrolled/ 306 completed 227M/101F 49.2 years (10.55) Bepirovirsen 300 mg +LD 653 enrolled/ 580 completed 461M/192F

Study Identifier **Study Status;** **Study Phase** **Study Report Location;**	**Study Design**	**Clinical Pharmacology Aspect Characterized**	**Healthy Participants or Diagnosis of Patients**	**No. of Participants enrolled/completed** **Sex M/F** **Mean Age (SD)**
				50.2 years (11.77)
219288 (B-Well 2) Phase 3 m5.3.5.1	Randomized, Double-blind, Placebo-controlled	Assessment of the impact of ADA and injection site on bepirovirsen PK and PD	NA treated participants with chronic HBV infection	Placebo 286 enrolled/ 261 completed 202M/84F 49.2 years (11.41) Bepirovirsen 300 mg +LD 571 enrolled/ 533 completed 414M/157F 48.7 years (10.40)
205873 Phase 1 QTc Study m5.3.5.4	Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, PK, SC	• Characterize the relationship between QTcF and bepirovirsen concentrations in plasma • Predict the 90% CI for the change in QTcF after supratherapeutic dose of bepirovirsen	Healthy participants	Bepirovirsen 600 mg 5 enrolled/ 5 completed 2M/3F 31.4 years (11.24) Bepirovirsen 450 mg 18 enrolled/ 18 completed 8M/10F 39.4 years (7.96)

表 13 Analyses Characterizing the Clinical Pharmacology of Bepirovirsen

Analysis Report Location	• **Clinical Pharmacology Aspect Characterized**
PopPK analysis Phase 1-3 analysis (cross-study analysis) m5.3.3.5	• Bepirovirsen Population PK parameter estimates • Identification of covariates and quantification of covariate effects on PK • Simulation of bepirovirsen exposure in different subpopulations
Simulation-based DDI assessment of the effect of bepirovirsen on NA PK (Phase 2b Study 209668) m5.3.3.4	• Impact of bepirovirsen on entecavir and tenofovir PK exposure based on comparison of NA PK data collected in Phase 2b Study 209668 (when bepirovirsen was co-administered) to entecavir and tenofovir PK profiles simulated using published PK models for entecavir and tenofovir disoproxil fumarate
PK-HBsAg-ALT analysis Phase 2-3 cross-study analysis m5.3.4.2	• PK-PD parameter estimates • Identification of covariates and quantification of covariate effects on response to bepirovirsen (IC50) • Simulations to assess the clinical relevance of significant covariates and support dose recommendations and any required dose adjustments • Characterization of the relationship between bepirovirsen PK, HBsAg suppression and ALT elevation
PK-Platelet analysis Phase 1-3 cross-study analysis m5.3.4.2	• PK-PD parameter estimates • Identification of covariates and quantification of covariate effects on PD parameters • Simulations to assess the clinical relevance of significant covariates and support dose recommendations
Cp-QTc analysis (Study 205873) m5.3.5.4	• Characterization of the relationship between bepirovirsen concentrations in plasma and changes in QTcF utilizing an exposure-response model developed using data following administration of both a single 600 mg dose and a single 450 mg dose • Predict the 90% CI for the change in QTcF at the highest bepirovirsen concentration expected to be observed in humans with therapeutic (300 mg) and supratherapeutic (600 mg) doses.

表 14 Summary of Single Dose bepirovirsen Pharmacokinetic Parameters

Study Identifier Study Report Location	Participant Type No. of Participants	Route of Administration; Dose and Regimen (No. of Participants)	Bepirovirsen Summary Pharmacokinetic Parameters					
			Statistic	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	AUC (0-24) (µg.h/mL)	AUC (0-inf) (µg.h/mL)	t1/2 (days)
Phase 1 Study FTIH study (213725) m5.3.3.1	Healthy participants N=16 (Active=12, Placebo=4)	SC; 75 mg (N=3)	Geo Mean (%CV) Median (Range)	- - 4.00 (3.00, 6.00)	1.29 (55.9) 0.977 (0.931, 2.35)	14.5 (153) - -	-	-
		SC; 150 mg (N=3)	Geo Mean (%CV) Median (Range)	- - 8.00 (6.00, 8.00)	4.48 (35.0) 3.89 (3.51, 6.61)	55.1 (42.2) - -	-	-
		SC; 300 mg (N=3)	Geo Mean (%CV) Median (Range)	- - 8.00 (6.00, 8.00)	9.47 (3.66) 9.57 (9.09, 9.76)	112 (5.04) - -	-	-
		SC; 450 mg (N=3)	Geo Mean (%CV) Median (Range)	- - 3.00 (3.00, 8.00)	15.5 (24.9) 14.5 (12.6, 20.3)	193 (11.1) - -	-	-

Study Identifier Study Report Location	Participant Type No. of Participants	Route of Administration; Dose and Regimen (No. of Participants)	Bepirovirsen Summary Pharmacokinetic Parameters					
			Statistic	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	AUC (0-24) (µg.h/mL)	AUC (0-inf) (µg.h/mL)	t1/2 (days)
Phase 2 Study (205695) m5.3.4.2	Treatment-naïve participants with chronic HBV infection (N=18) Placebo (N=6)	Cohort 1 SC; Bepirovirsen 150 mg (N=6)	Geo Mean (%CV) Median (range)	- - 4.43 (3.00, 5.87)	3.33 (48.3) - -	41.74 (38.7) - -	-	-
		Cohort 2 and 3 SC, Bepirovirsen 300 mg (N=12)	Geo Mean (%CV) Median (range)	- - 3.84 (1.95; 6.00)	10.01 (38.3) - -	126.44 (39.2) - -	-	-
	Participants with chronic HBV infection on NA regimen (N=5) Placebo (N=2)	Cohort 4 SC; Bepirovirsen 300 mg plus Tenofovir or Entecavir (N=5)	Geo Mean (%CV) Median (range)	- - 3.97 (3.85; 4.83)	9.50 (22.7) - -	119.06 (28.9) - -	-	-
Phase 1 Study 205871 PK in hepatic impairment (B-Assured) m5.3.3.3	Participants with hepatic impairment (N=12) Healthy participants (N=12)	SC; 300 mg Moderate hepatic impairment (N=12)	Geo Mean (95% CI) (%CV) Median (Range)	- - - 4.000 (3.00, 12.00)	6.570 (4.680, 9.224) (57.4) - -		75.07 (61.19, 92.10) (33.0) - -	9.68 (7.79, 12.01) (35.0) - -
		SC; 300 mg Healthy Participant Control (N=12)	Geo Mean (95% CI) (%CV) Median (Range)	- - - 5.058 (4.00, 8.08)	9.828 (7.519, 12.85) (44.1) - -		108.9 (85.90, 138.1) (36.5) - -	8.54 (7.02, 10.39) (29.8) - -

Study Identifier Study Report Location	Participant Type No. of Participants	Route of Administration; Dose and Regimen (No. of Participants)	Bepirovirsen Summary Pharmacokinetic Parameters					
			Statistic	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	AUC (0-24) (µg.h/mL)	AUC (0-inf) (µg.h/mL)	t1/2 (days)
Phase 1 Study 219239 Relative Bioavailability Study m5.3.1.2	Healthy Participant Group 1: 46 Group 2: 49 Group 3: 32 Group 4: 33	SC; 300 mg (2x150 mg/mL) Vial by HCP (N=46)	Geo Mean (95% CI) (%CV)	-	9.87 (8.78, 11.10) (40.96)		111.84 (101.68, 123.02) (32.93)	-
		SC; 300 mg (2x150 mg/mL) PFS SSD by HCP (N=49)	Geo Mean (95% CI) (%CV)	-	10.24 (9.18, 11.43) (39.54)		119.27 (109.71, 129.66) (29.70)	-
		SC; 300 mg (2x150 mg/mL) PFS SSD by Self Post-Training (N=29)	Geo Mean (95% CI) (%CV)	-	10.39 (8.89, 12.14) (42.70)		119.08 (107.93, 131.38) (26.28)	-
		SC; 300 mg (2x150 mg/mL) PFS SSD by Self Without Training (N=29)	Geo Mean (95% CI) (%CV)	-	9.52 (8.02, 11.29) (47.41)		112.34 (98.71, 127.85) (35.01)	-
Phase 1 QTc Study (205873) m5.3.5.4	Healthy participants N=46 Bepirovirsen 600mg (Active=5, Placebo=5) Bepirovirsen 450mg (Active=18, Placebo=18)	SC, 450mg (3 × 150 mg)	Geo Mean (90% CI) (%CV) Median (Range)	- - - 4.00 (0.50, 8.00)	15.77 (14.00, 17.76) (29.61) - -	169.80 (153.56, 187.75) (24.88) - -	-	-
		SC, 600mg (4 × 150 mg)	Geo Mean (90% CI) (%CV) Median (Range)	- - - 4.00 (3.00, 6.00)	16.88 (11.39, 25.02) (43.07) - -	204.01 (151.91, 273.98) (31.68) - -	-	-

表 15　Summary of Multiple Dose Bepirovirsen Pharmacokinetic Parameters

Study Identifier Study Report Location	Participant Type No. of Participants	Route of Administration; Dose and Regimen (No. of Participants) Day of PK	Bepirovirsen Summary Pharmacokinetic Parameters						
			Statistic	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	Ctrough (µg/mL)	AUC(0-24) (µg.h/mL)	AUC(0-tau) (µg.h/mL)	t1/2 λz (days)
Phase 1 Study FTIH study (213725) m5.3.3.1	Healthy participants N=12	SC; 150 mg (N=3) Day 22	Geo Mean	-	3.68	-	37.2	-	-
			(%CV)	-	(11.0)		(7.72)		-
			Median	8.00	-		-		22.5
			(Range)	(4.00, 8.00)	-		-		(13.7, 30.8)
		SC; 300 mg (N=3) Day 22	Geo Mean	-	7.70	-	102	-	-
			(%CV)	-	(31.2)		(19.6)		-
			Median	6.00	-		-		23.8
			(Range)	(4.00, 8.00)	-		-		(18.3, 30.4)
		SC; 450 mg (N=3) Day 22	Geo Mean	-	10.5	-	118	-	-
			(%CV)	-	(35.7)		(27.7)		-
			Median	3.00	-		-		24.6
			(Range)	(2.00, 4.00)	-		-		(21.3, 25.9)

Study Identifier Study Report Location	Participant Type No. of Participants	Route of Administration; Dose and Regimen (No. of Participants) Day of PK	Bepirovirsen Summary Pharmacokinetic Parameters						
			Statistic	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	Ctrough (µg/mL)	AUC(0-24) (µg.h/mL)	AUC(0-tau) (µg.h/mL)	t1/2 λz (days)
Phase 2 Study (205695) m5.3.4.2	Treatment-naïve participants with chronic HBV infection (N=18) Placebo (N=6)	Cohort 1 SC; Bepirovirsen 150 mg (N=6) Day 22	Geo Mean (%CV) Median (Range)	- - 3.02 (2.85, 4.85)	3.90 (49.9) - -	-	45.25 (33.2) - -	58.05 (19.3) - -	- - 14.22 (1.57, 15.56)
		Cohort 2 and 3 SC; Bepirovirsen 300 mg (N=12) Day 22	Geo Mean (%CV) Median (Range)	- - 3.44 (2.00, 5.08)	9.07 (30.2) - -	-	112.49 (29.0) - -	142.52 (23.6) - -	- - 16.41 (9.29, 20.93)
	Participants with chronic HBV infection on NA regimen (N=5) Placebo (N=2)	Cohort 4 SC; Bepirovirsen 300 mg plus Tenofovir or Entecavir (N=5) Day 22	Geo Mean (%CV) Median (Range)	- - 3.89 (3.00, 5.83)	7.66 (71.8) - -	-	99.85 (58.0) - -	143.27 (25.1) - -	- - 8.29 (7.56, 15.51)

Study Identifier Study Report Location	Participant Type No. of Participants	Route of Administration; Dose and Regimen (No. of Participants) Day of PK	Bepirovirsen Summary Pharmacokinetic Parameters						
			Statistic	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	Ctrough (µg/mL)	AUC(0-24) (µg.h/mL)	AUC(0-tau) (µg.h/mL)	t1/2 λz (days)
Phase 2b Study 209668 (B-Clear) m5.3.5.1	Patients with chronic HBV infection on-NA cohort (N= 225)	SC; Bepirovirsen 300 mg; 24 weeks. (N=68)	Geo Mean (95% CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.0249 (0.0212, 0.0293) (72.19) - -	-	-	- - - 28.90 (7.52, 191.98)
		Intense PK (n=12) Week 24 Day 162 (Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (%CV) Median (Range)	(Intense PK) - - 3.017 (2.00, 5.00)	(Intense PK) 13.90 (43.36) - -	-	(Intense PK) 134.99 (31.31) - -	(Intense PK) 147.04 (30.97) - -	-
		SC; Bepirovirsen 300 mg; 12 weeks followed by bepirovirsen 150 mg; 12 weeks. (N=68)	Geo Mean (95% CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.0154 (0.0132, 0.0181) (68.11) - -	-	-	- - - 24.92 (8.84, 216.43)
		Intense PK for 150 mg (n=12) Week 24 Day 162(Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (%CV) Median (Range)	(Intense PK) - - 3.008 (2.00, 4.02)	(Intense PK) 5.32 (66.14) - -	-	(Intense PK) 49.82 (54.19) - -	(Intense PK) 56.14 (49.35) - -	-

Study Identifier Study Report Location	Participant Type No. of Participants	Route of Administration; Dose and Regimen (No. of Participants) Day of PK	Bepirovirsen Summary Pharmacokinetic Parameters						
			Statistic	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	Ctrough (µg/mL)	AUC(0-24) (µg.h/mL)	AUC(0-tau) (µg.h/mL)	t1/2 λz (days)
		SC; Bepirovirsen 300 mg; 12 weeks followed by placebo; 12 weeks. (N=68) Week 13 Day 85 (Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (95% CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.0195 (0.0167, 0.0227) (68.17) - -	-	-	- - - 16.45 (5.98, 71.85)
		Placebo; 12 weeks followed by bepirovirsen 300 mg; 12 weeks. (N=23) Week 24 Day 162 (Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (95% CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.0191 (0.0145, 0.0250) (67.28) - -	-	-	- - - 15.71 (6.84, 83.34)
	Patients with chronic HBV infection Not-on-NA cohort (N= 229)	SC; Bepirovirsen 300 mg; 24 weeks. (N=70) Week 24 Day 162 (Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (95% CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.0248 (0.0220, 0.0280) (51.10) - -	-	-	- - - 27.85 (10.19, 149.74)
		SC; Bepirovirsen 300 mg; 12 weeks followed by bepirovirsen 150 mg; 12 weeks. (N=68) Week 24 Day 162 (Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (95% CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.0154 (0.0129, 0.0183) (78.65) - -	-	-	- - - 38.21 (6.87, 161.83)

Study Identifier Study Report Location	Participant Type No. of Participants	Route of Administration; Dose and Regimen (No. of Participants) Day of PK	Bepirovirsen Summary Pharmacokinetic Parameters						
			Statistic	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	Ctrough (µg/mL)	AUC(0-24) (µg.h/mL)	AUC(0-tau) (µg.h/mL)	t1/2 λz (days)
		SC; Bepirovirsen 300 mg; 12 weeks followed by placebo; 12 weeks. (N=68) Week 13 Day 85 (Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (95% CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.0207 (0.0177, 0.0241) (65.99) - -	-	-	- - - 17.27 (6.60, 101.39)
		placebo; 12 weeks followed by bepirovirsen 300 mg; 12 weeks (N=24) Week 24 Day 162 (Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (95% CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.0157 (0.0118, 0.0207) (73.14) - -	-	-	- - - 19.19 (7.64, 644.52)
Phase 2a Study 212602 (B-Fine) m5.3.5.2	HBeAg-negative chronic HBV infection on stable NA therapy (N=11)	SC; Bepirovirsen 300 mg and 12 weeks (loading dose on Days 4 and 11) (N=12) Week 12 Day 78 (Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (95%CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.015 (0.009, 0.024) (76.93) - -	-	-	- - - 16.738 (13.48, 45.59)

Study Identifier Study Report Location	Participant Type No. of Participants	Route of Administration; Dose and Regimen (No. of Participants) Day of PK	Bepirovirsen Summary Pharmacokinetic Parameters						
			Statistic	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	Ctrough (µg/mL)	AUC(0-24) (µg.h/mL)	AUC(0-tau) (µg.h/mL)	t1/2 λz (days)
Phase 2b Study 209348 (B-Together) m5.3.5.4	Arm 1 Participants with chronic hepatitis B on stable nucleos(t)ide therapy (N=49)	SC; Bepirovirsen 300 mg; 24 weeks followed by PegIFN; 24 weeks (N=55) Week 24 Day162 (Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (95%CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.020 (0.017, 0.024) (64.03) - -	-	-	- - - 20.50 (7.65, 54.80)
	Arm 2 Participants with chronic hepatitis B on stable nucleos(t)ide therapy (N=50)	SC; Bepirovirsen 300 mg 12 weeks followed by PegIFN; 24 weeks. (N=53) Week 12 Day 78 (Last visit as representative of Ctrough)	Geo Mean (95%CI) (%CV) Median (Range)	-	-	0.015 (0.013, 0.018) (50.70) - -	-	-	- - - 20.80 (13.10, 53.90)
Phase 3 Study 202009 (B-Well 1) m5.3.5.1	NA treated participants with chronic hepatitis B virus Bepirovirsen (N=978)	SC, Placebo 24 weeks + LD in Week 1 and 2 (N=306)	-	-	-	-	-	-	-
		SC, Bepirovirsen 300mg 24 weeks + LD in Week 1 and 2 (N=580) Week 24 Day162	Mean (SD) (%CV)	-	-	0.0275 (0.0709) (257.42)	-	-	-
Phase 3 Study 219288 (B-Well 2) m5.3.5.1	NA treated participants with chronic hepatitis B virus Bepirovirsen	SC, Placebo 24 weeks + LD in Week 1 and 2 (N=261)	-	-	-	-	-	-	-
		SC, Bepirovirsen 300mg 24 weeks + LD in Week 1 and 2 (N=533)	Mean (SD) (%CV)	-	-	0.0263 (0.0681) (258.50)	-	-	-

Study Identifier Study Report Location	Participant Type No. of Participants (N=856)	Route of Administration; Dose and Regimen (No. of Participants) Day of PK	Bepirovirsen Summary Pharmacokinetic Parameters						
			Statistic	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	Ctrough (µg/mL)	AUC(0-24) (µg.h/mL)	AUC(0-tau) (µg.h/mL)	t1/2 λz (days)
		Week 24 Day162							

表 16 Population Pharmacokinetic Parameters of Bepirovirsen following SC Administration

Model Parameter	Description	Estimate	RSE (%)[a]	IIV (CV%)	Shrinkage (%)
KA (1/hr)	Absorption rate constant	0.227	1.39	25.7	49.5
ALAG1 (hr)	Absorption lag time	0.148	4.77	126	60.5
CL/F (L/hr)	Apparent systemic clearance	2.99	1.22	32.7	22.5
WT on CL/F	Baseline body weight exponent on CL/F	0.388	5.68	--	--
ADA on CL/F	Proportional change in CL/F for ADA positive	0.734	0.0384	--	--
V2/F (L)	Apparent volume of distribution of the central compartment	10.7	1.2	39.7	45.3
WT on V2/F	Baseline body weight exponent on V2/F	1.23	6.17	--	--
Q3/F (L/hr)	Apparent intercompartmental clearance between central and shallow peripheral compartments	0.0894	1.10	46.9	45.0
V3/F (L)	Apparent volume of distribution of the shallow peripheral compartment	17.7	1.20	85.0	40.5
Q4/F (L/hr)	Apparent intercompartmental clearance between central and deep peripheral compartments	0.0317	1.16	140	25.6
V4/F (L)	Apparent volume of distribution of the deep peripheral compartment	42.5	1.01	160	17.5
RV	CCV residual error	0.0520 (22.8%)	1.22	--	--

Source: m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report, Table 3
a. Reported RSE% are for the log-transformed parameter values.

表 17 Summary of Significant Patient Covariate Effects on the Population Pharmacokinetic Parameters of Bepirovirsen

Pharmacokinetic Parameter	Description	Significant Covariate	Estimate	Effect
CL/F (L/hr)	Baseline body weight exponent on CL/F	[redacted]		
CL/F (L/hr)	Proportional change in CL/F for ADA positive			
V2/F (L)	Baseline body weight exponent on V2/F			

Source: m5.3.3.5, Ph3 PopPK Report, Table 3

表 18 Parameter Estimates of the Final PK-HBsAg Model for Bepirovirsen following SC Administration

Model Parameter	Description	Estimate	RSE (%)	IIV (CV%)	Shrinkage (%)
System Parameters					
SAG0 (IU/mL)	Baseline HBsAg level	[redacted]			
kdeg,HBsAg (1/hr)	Elimination rate constant of HBsAg from serum ksyn,HBsAg (IU/mL/hr) = SAG0*kdeg,HBsAg				
ktr,HBsAg (1/hr)	Transit rate of HBsAg between compartments				
SRThreshold (IU/mL)	HBsAg nadir threshold for sustained response				
Bepirovirsen-Related Parameters					
Imax	Maximum inhibition of HBsAg synthesis by bepirovirsen				
IC50 (ng/mL)	bepirovirsen concentration resulting in 50% reduction in HBsAg synthesis				
Hill	Hill coefficient for effect of bepirovirsen on HBsAg synthesis inhibition				
RV	Additive error on log-transformed data				

Source: m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report, Table 3

The typical participant with chronic HBV infection is 45 years old, with baseline HBsAg ≤1000 IU/mL, and with HBV [redacted]

a. The reported IIV value for [redacted] the variance (ω2) of the eta distribution in the logit domain.

表 19 Parameter Estimates of the PK-Platelet Model

Model Parameter	Description	Estimate	RSE (%)	IIV (CV%)	Shrinkage (%)
CircP0 ($10^{9/L}$)	Baseline platelet count	[redacted]			
Ktr (1/hr)	Transit rate of platelets mean transit time = 4/ktr				
γ	Feedback parameter				
Eslope (1/ng/ml)	Linear drug effect on inhibition of platelet production				
[redacted]					
RV	CCV residual error				

Source: m5.3.4.2, Ph3 PopPK-PD Report, Table 9

[redacted]

2.7.2.4 特別な試験

Confidential

目次

略号等一覧 3
4.B 特別な試験 5
4.1.B 緒言 5
4.2.B 非臨床ウイルス学 6
4.2.1.B In vitro 試験 6
4.2.2.B In vivo 試験 13
4.2.3.B 結合部位解析 15
4.3.B 臨床ウイルス学 22
4.3.1.B 臨床ウイルス学に関する目的 22
4.3.2.B 検体及び方法 22
4.3.3.B B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験 23
4.3.4.B B-Sure 試験 39
4.3.5.B B-Clear 試験 41
4.3.6.B B-Clear 試験での iTACT HBs 抗原及び iTACT HBcr 抗原解析 48
4.3.7.B B-Together 試験 50
4.3.8.B B-Fine 試験 51
4.3.9.B 205695 試験（旧称 ISIS 505358-CS3 試験） 53
4.4.B 臨床免疫学 55
4.4.1.B 臨床免疫学に関する目的 55
4.4.2.B 205695 試験（旧称 ISIS 505358-CS3 試験） 55
4.4.3.B B-Clear 試験 57
4.4.4.B B-Clear 試験－探索的バイオマーカー解析 59
4.4.5.B B-Together 試験 60
4.4.6.B B-Fine 試験 64
4.4.7.B 219239 試験 67
4.4.8.B 205873 試験 68
4.5.B 臨床ウイルス学の結論 69
5.B 付録 72

Confidential

略号等一覧

略号（略称）	英語	日本語
2’-MOE	2’-*O*-methoxy ethyl	2’-*O*-メトキシエチル
ADH4	alcohol dehydrogenase 4	アルコール脱水素酵素 4
AGXT	alanine-glyoxylate aminotransferase	アラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ
AIFM1	apoptosis inducing factor mitochondria associated 1	ミトコンドリア関連アポトーシス誘導因子 1
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AP-1	activator protein-1	アクチベーター蛋白質-1
ASO	antisense oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
CA5A	carbonic anhydrase 5A	炭酸脱水酵素 5A
cccDNA	covalently closed circular DNA	共有結合閉環状 DNA
CCL	C-C motif chemokine ligand	C-C モチーフケモカインリガンド
CCNB2	cyclin B2	サイクリン B2
CD	cluster of differentiation	分化クラスター
CSR	clinical study report	総括報告書
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand	C-X-C モチーフケモカインリガンド
DEP	differentially expressed protein	発現量が変化した蛋白質
DIVI	drug-induced vascular injury	薬剤性血管損傷
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
DR	direct repeat	－
EC50	effective concentration 50	最大作用の 50%に達する濃度
eGFR	estimated glomerular filtration rate	推算糸球体濾過率
ELF	enhanced liver fibrosis	肝線維化進展
FC	functional cure	機能的治癒
FNA	fine needle aspirate	穿刺吸引細胞診
FOS	Fos proto-oncogene	Fos プロトオンコジーン
GSK	GlaxoSmithKline	グラクソ・スミスクライン
GT	genotype	遺伝子型
GZMB	granzyme B	グランザイム B
H2BC14	H2B clustered histone 14	H2B クラスター化ヒストン 14
HBcr	hepatitis B core-related	B 型肝炎コア関連
HBs	hepatitis B surface	B 型肝炎ウイルス表面
HBV	hepatitis B virus	B 型肝炎ウイルス
HBx	hepatitis B x protein	B 型肝炎ウイルス X 蛋白質
HTRA2	HtrA serine protease 2	HtrA セリンプロテアーゼ 2
IFN	interferon	インターフェロン
IFNG	interferon gamma	インターフェロンγ
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
IL	interleukin	インターロイキン
ISE	integrated summary of efficacy	－
iTACT	immunoassay for total antigen including complex via pretreatment	－
Ki67	marker of proliferation Ki-67	増殖マーカーKi-67
KRT18	keratin 18	ケラチン 18
LD	loading dose	負荷投与

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

略号（略称）	英語	日本語
LLOD	lower limit of detection	検出下限
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MS4A1	membrane spanning 4-domains A1	膜貫通ドメイン A1
NA	nucleos(t)ide analogue	核酸アナログ
NGS	next generation sequencing	次世代シーケンシング
NK	natural killer	ナチュラルキラー
OT	off treatment	－
P	polymerase	ポリメラーゼ
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核細胞
PD1	programmed cell death 1	プログラム細胞死 1
PegIFN	pegylated interferon	ペグインターフェロン
PFS	prefilled syringe	プレフィルドシリンジ
pgRNA	pre-genomic RNA	プレゲノム RNA
PGx	pharmacogenetics	薬理遺伝学
PHH	primary human hepatocytes	初代ヒト肝細胞
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
PLEKGH1	pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G1	－
ProC3	N-terminal type III collagen propeptide	III 型コラーゲン N 末端プロペプチド
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
QTc	corrected QT interval	補正 QT 間隔
rcDNA	relaxed circular DNA	環状不完全二重鎖 DNA
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RNase	ribonuclease	リボヌクレアーゼ
RoW	rest of world	中国を除くすべての国
RT	reverse transciptase	逆転写酵素
scRNA	single cell RNA	単一細胞 RNA
SSD	safety syringe device	安全装置付きシリンジ
SVR	sustained virological response	持続的なウイルス学的効果
TCF1	T cell factor 1	T 細胞因子 1
TEMRA	T effector memory RA	－
TGFβ	transforming growth factor β	形質転換増殖因子 β
TLR	toll like receptor	Toll 様受容体
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TNFα	tumor necrosis factor α	腫瘍壊死因子 α
TYMS	thymidylate synthase	チミジル酸合成酵素
ULN	upper limit of normal	基準値上限
UTR	untranslated region	非翻訳領域
VSR	virology study report	臨床ウイルス学的解析報告書
XCL	X-C motif chemokine ligand	X-C モチーフケモカインリガンド

Confidential

4.B 特別な試験

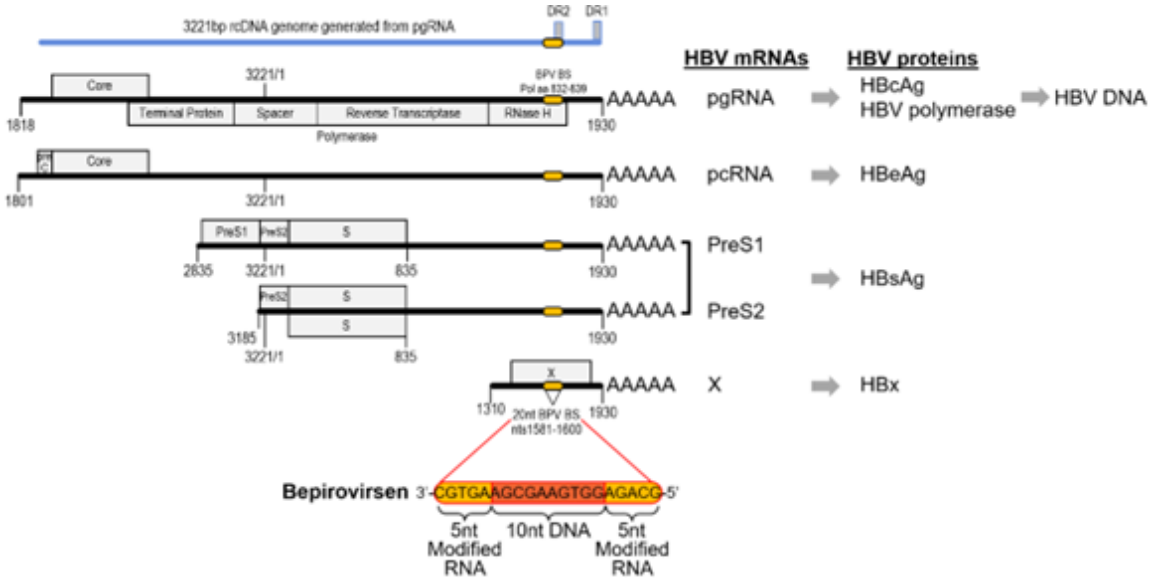
4.1.B 緒言

ベピロビルセンナトリウム（ベピロビルセン、GSK3228836 又は ISIS 505358）は 2’-MOE 修飾ホスホロチオエート ASO であり、HBV の 20 ヌクレオチドの配列を標的とする。ベピロビルセンの結合部位は、HBV ポリメラーゼ（pgRNA）及び HBx（X mRNA）のコード領域、並びにプレコア、pre-S1 及び pre-S2/S をコードする mRNA の 3'-UTR を含む全種類の HBV mRNA に存在する（図 1）。ASO の結合部位は、HBV ポリメラーゼ蛋白質の RNase H 領域内に位置する、832 番～839 番のアミノ酸残基（VHFASPLH）である。これらの領域は、NA 耐性変異に関連する逆転写酵素領域とは異なる[Menendez-Arias, 2014; Stuyver, 2001; Panjaworayan, 2007]。pre-S1 及び pre-S2/S をコードする mRNA の結合部位は 3'-UTR 内に位置し（1581 番～1600 番のヌクレオチド）、S 蛋白質のコード領域（終始コドンは 835 番のヌクレオチド）から離れている。また、ベピロビルセンの結合部位は、ウイルス複製に重要な HBV rcDNA の DR2 領域に対して相補的な配列を有する。DR2 領域は、HBV DNA が宿主ゲノムに統合される際にしばしば失われる DR1 領域から離れているため[Wooddell, 2017]、この結合部位は HBV cccDNA 及び宿主ゲノムに統合された HBV DNA の両方の mRNA に存在すると考えられる。このため、ベピロビルセンは両タイプの mRNA 由来のウイルス蛋白質の産生を低下させることが可能である。

ベピロビルセンのハイブリダイゼーション（結合）により HBV RNA の分解が誘導され、ウイルス蛋白質量及び HBV DNA 量が低下する。ベピロビルセンの結合部位及びその HBV ゲノム内での位置に関する相対的な番号付けの詳細を表 21 に示す。これらの番号は、m2.7.2.4 を通してベピロビルセンの結合部位を示すために用いられる。非臨床ウイルス学については Section 4.2.B に示す。各臨床試験の臨床ウイルス学及び臨床免疫学についてはそれぞれ Section 4.3.B 及び Section 4.4.B に示す。

Confidential

図 1　Schematic of the bepirovirsen binding site on HBV mRNAs



Bepirovirsen binds to the protein coding sequence (CDS) of the HBx mRNA and the RNase H domain of HBV polymerase pgRNA (grey boxes), as well as the 3'-UTR of the precore, preS1, and preS2/S mRNA (black line outside the CDS). Numbers indicate nucleotide positions on mRNA based on sequence information of GenBank ID AM282986.1 reference genome. Graphic modified from Yu, 2023.

4.2.B 非臨床ウイルス学

ベピロビルセンの臨床使用（単独又は核酸アナログとの併用療法）を裏付けるため、非臨床ウイルス学的試験として、一連の in vitro 及び in vivo 試験を実施した。ベピロビルセンが HBV mRNA を標的とし、ウイルスマーカーを抑制することを示すため、HBV ゲノムを組み込んだヒト肝癌由来細胞株 HepG2.2.15、HBV を感染させた初代ヒト肝細胞（PHH）及び HBV トランスジェニックマウス等の種々の非臨床モデルを用いた検討を行った。更に、データベースを用いて HBV genotype（GT）におけるベピロビルセン結合部位の保存性を解析するとともに、臨床試験で得られた HBV 変異株の同定及び表現型解析を行った。

4.2.1.B　In vitro 試験

4.2.1.1.B　HepG2.2.15 細胞株を用いた検討

ベピロビルセンは、HBV GT に共通して保存される領域を標的とし、HBV mRNA 発現を阻害するようデザインされた 2'-MOE 修飾ホスホロチオエート ASO のスクリーニングにより選択された［m5.3.5.4, GSK Document Number 2019N419724_00］。ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 に HBV ゲノムを組み込んだ HepG2.2.15 細胞株[Sells, 1987]は、pgRNA、プレコア mRNA、pre-S1 mRNA、pre-S2/S mRNA 及び X mRNA 等のすべての HBV mRNA を発現することから、ベピロビルセンのスクリーニング及びその後の特性解析に用いた。HepG 2.2.15 細胞株は、エンテカビル（ETV）及びテノホビル ジソプロキシルフマル酸塩（TDF）等の核酸アナログの抗 HBV 活性の特性解析にも広く使用されている[Innaimo, 1997; Delaney, 2006]。

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

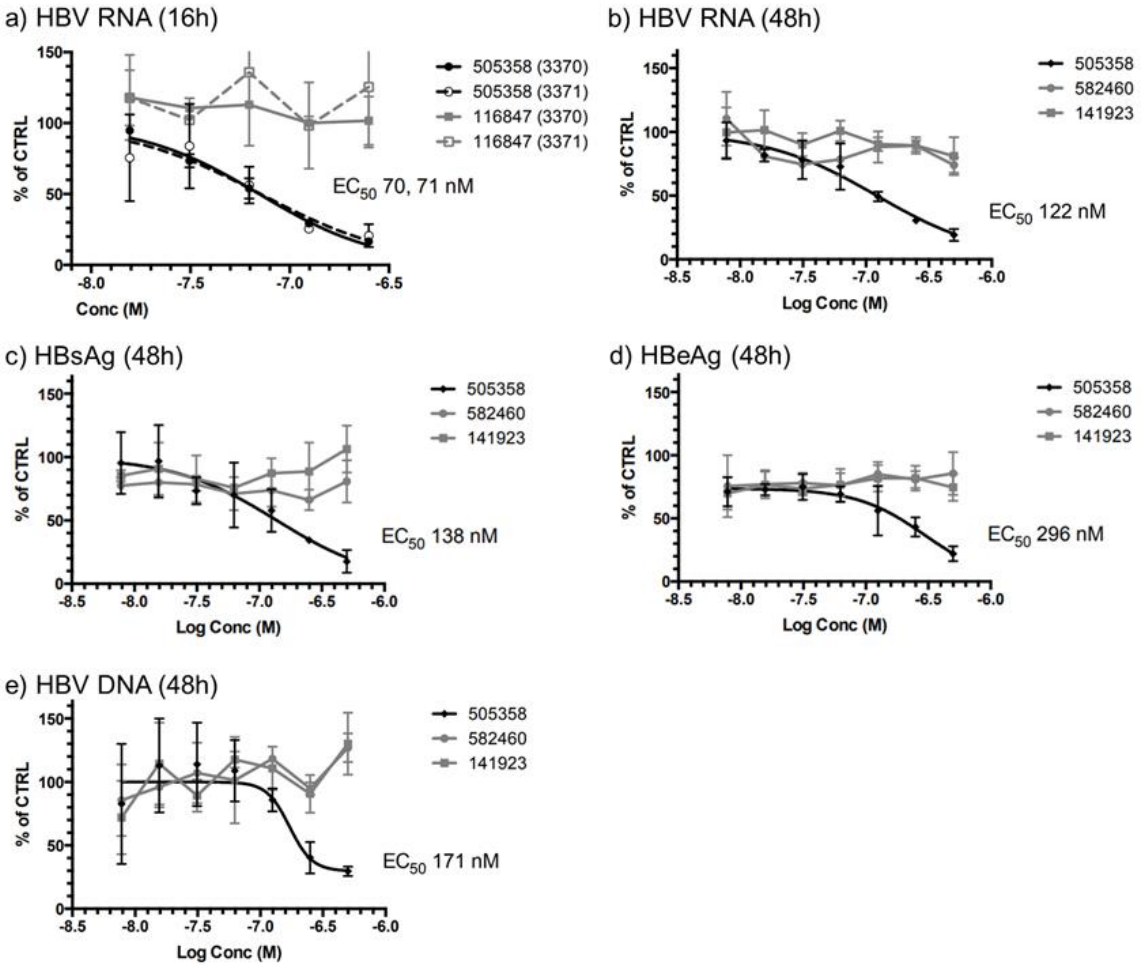
最初の試験では、HBV mRNA に対するベピロビルセンの阻害作用を検討した。ベピロビルセン（15.6～250 nM）をリポフェクション法により HepG2.2.15 細胞内に導入し、その 16 時間後に、2 種類の異なるプライマー/プローブセット（いずれも HBV の pgRNA、pre-S1 及び pre-S2/S mRNA を標的とするが、異なる領域をターゲットとしている）を用いた qRT-PCR により mRNA 発現量を測定した。その結果、細胞内 HBV mRNA の発現量がベピロビルセンの濃度依存的に減少した（2 種類のプローブを用いたアッセイで得られた EC50 はそれぞれ、70 及び 71 nM）（図 2 a）。

次の試験では、HBV mRNA に加え、HBs 抗原、HBe 抗原及び HBV DNA に対する阻害作用を検討した。ベピロビルセン（15.6～500 nM）をリポフェクション法により HepG 2.2.15 細胞内に導入し、その 48 時間後に、細胞内 mRNA 発現量（qRT-PCR）、培養上清中の HBs 抗原及び HBe 抗原量（ELISA 法）並びに細胞内 HBV DNA 量（qPCR）を測定した。その結果、最初の試験と同様、細胞内 HBV mRNA の発現量はベピロビルセンの濃度依存的に減少した（EC50 は 122 nM）（図 2 b）。また、培養上清中 HBs 抗原及び HBe 抗原量、並びに細胞内 HBV DNA も濃度依存的に減少することが示された（図 2 c-e）。

以上より、HepG 2.2.15 細胞株をベピロビルセンで処理することにより、ウイルス複製の鋳型となる HBV pgRNA、プレコア mRNA、pre-S1 mRNA 及び pre-S2/S mRNA、並びにそれらの mRNA から産生される HBe 抗原及び HBs 抗原が減少することが示された。

Confidential

図 2　Bepirovirsen reduced HBV gene products in HepG2.2.15 cells



Source: m5.3.5.4, GSK Document Number 2019N419724_00 Figures 6 a-d, 4 - Reduction of intracellular HBV RNA a) 16h after transfection of bepirovirsen (ISIS 505358) into HepG2.2.15 across 2 different sets of qPCR primer / probes (3370, 3371) targeting different regions of the HBV pgRNA, preS1, and preS2/S mRNA, and b) 48h after transfection of bepirovirsen (ISIS 505358) into HepG2.2.15. Inhibition of secreted c) HBsAg, d) HBeAg, and e) HBV DNA 48h after transfection of bepirovirsen (ISIS 505358) into HepG2.2.15. No reduction of HBV RNA, HBsAg, HBeAg, and HBV DNA 16 or 48h after transfecting non-HBV targeting control ASOs (ISIS 141923 – no known human target gene, 582460 – targeting human ACTN1, 116847 targeting human PTEN). HBsAg and HBeAg levels in the supernatant were detected by ELISA. Intracellular HBV RNA and secreted HBV DNA were detected by qPCR. Graphs indicate average ± standard deviation as percent relative to control (n=2 for a, n=3 for b-e).

4.2.1.2.B　HepG2.2.15 細胞株において ETV 又は TDF と併用処理した時の作用

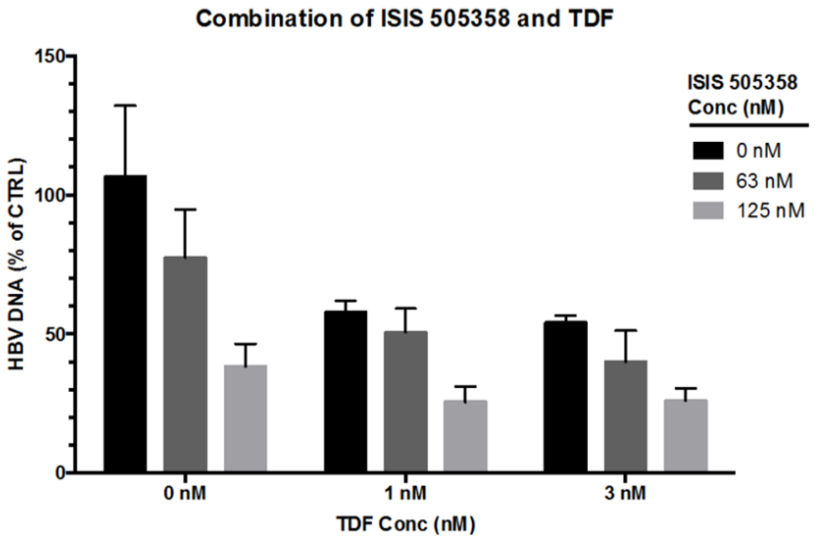
HepG2.2.15 細胞株にベピロビルセン及び HBV 治療薬として用いられている核酸アナログ（ETV 又は TDF）を EC50 付近の濃度で併用した時の抗 HBV 活性を評価した［m5.3.5.4, GSK Document Number 2019N419632_00］。

ベピロビルセン（0、63 及び 125 nM）をリポフェクション法により HepG 2.2.15 細胞内に導入し、4 時間後に TDF（0、1 及び 3 nM）を培地中に添加した。その 4 日後、qPCR により細胞内 HBV DNA 量を測定した。その結果、ベピロビルセン又は TDF の単独群では HBV DNA 量の減少がみられ、併用群では同一濃度の単独群と比較して HBV DNA 量の更なる減少が認められた（図 3）。ベピロビルセンと ETV との併用時にも同様の結果が得られた（データは示していない）。

Confidential

このように、ベピロビルセンと核酸アナログ（ETV 又は TDF）との併用により、HBV DNA 量の減少作用が増強したことから、HBV 持続感染患者に対してこれらの薬剤を併用することの有用性が示唆された。

図 3　Inhibitory effects of bepirovirsen in combination treatment with nucleotide drug TDF in HepG2.2.15 cells



Source: m5.3.5.4, GSK Document Number 2019N419632_00, Figure 2 - HepG2.2.15 cells were treated with bepirovirsen and TDF at various concentrations and DNA levels measured at 4 days. Concentrations near the EC50 of each drug are shown. Addition of TDF to bepirovirsen (ISIS 505358) at 63 or 125 nM increases DNA reduction.

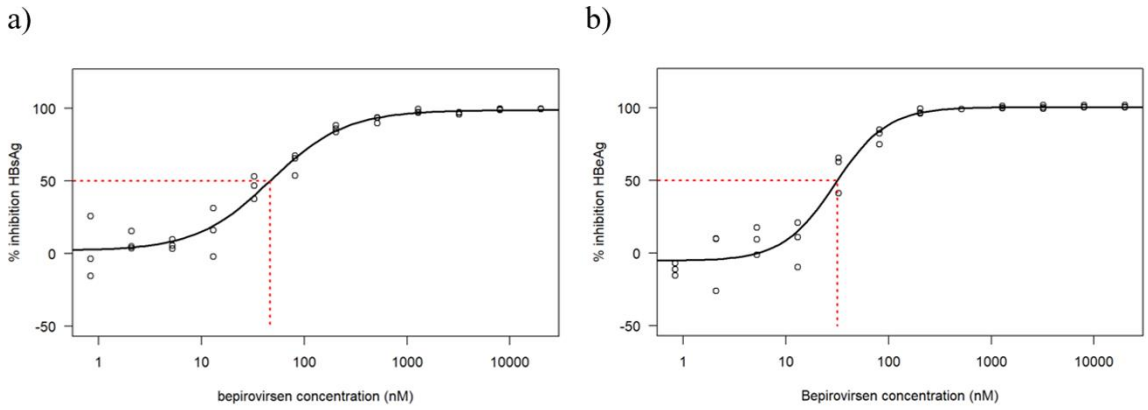
4.2.1.3.B　HBV を感染させたヒト初代肝細胞を用いた検討

HBV を感染させた PHH をベピロビルセンで処理し、HBs 抗原、HBe 抗原、HBV DNA、HBc 抗原及び HBx 等の HBV マーカーに対する作用を検討した［m5.3.5.4, GSK Document Number 2023N540221_01、2025N565074_00］。

野生型 HBV を PHH に感染させ、7 日後にベピロビルセン（最高濃度 20 μM）を添加して 15 日間インキュベートしたのち（感染 22 日）、培養上清中に分泌された HBs 抗原及び HBe 抗原量を ELISA 法により測定した（n=2）［m5.3.5.4, GSK Document Number 2023N540221_01］。その結果、HBs 抗原及び HBe 抗原量は、ベピロビルセンの濃度依存的に減少することが示された（図 4；代表として、1 回のアッセイの結果を示す）。HBs 抗原及び HBe 抗原量に対する減少作用の EC50（2 回のアッセイの平均値）はそれぞれ 47.1±0.7 nM 及び 29.8±2.9 nM であった（表 2）。

Confidential

図 4　Dose-response antiviral activity of bepirovirsen inhibiting HBsAg and HBeAg in primary human hepatocytes infected with HBV



Source: m5.3.5.4, GSK Document Number 2023N540221_01 Figure 3 and 4 - Infected PHH were treated with 12-point, 1:2.5 serially diluted bepirovirsen with a starting concentration of 20 000 nM. 4-parameter logistic response curves were fitted to percent a) HBsAg and b) HBeAg inhibition vs. log10(bepirovirsen concentration (nM)). Each point represents 1 of 3 biological replicates per bepirovirsen concentration. The concentration that elicited a response halfway between 0-100% HBsAg/HBeAg inhibition is indicated as absolute EC50 (red dotted line).

別の試験では、HBV を感染させた PHH を用い、HBx に対するベピロビルセンの作用を検討した［m5.3.5.4, GSK Document Number 2025N565074_00］。HBx は、E3 ユビキチンライゲース複合体の構成因子である DDB1 と結合することにより、宿主の E3 ユビキチンライゲース機構を乗っ取り、cccDNA からの mRNA 転写に抑制的に働く宿主蛋白 Smc5/6（Smc5 及び Smc6 のヘテロダイマー）[Decorsière, 2016; Murphy, 2016]をユビキチン化して分解する。すなわち、HBx は、Smc5/6 を除去することにより、cccDNA からの mRNA の転写を促進している[van Breugel, 2012]。HBx を直接測定することは困難であるため、本試験では、サロゲートマーカーとして HBx によって分解される核内 Smc6 蛋白質量を測定することにより、HBx 機能に及ぼす影響を評価した。

PHH に HBV を感染させ、その 3 日後にベピロビルセン（2.1 nM～20 μM）を添加し、14 日間インキュベートしたのち（感染 17 日）、免疫蛍光染色により HBc 抗原及び Smc6 を検出し、蛍光強度を定量した。一次抗体として、ウサギ抗 HBc 抗原抗体及びマウス抗 Smc6 抗体を用い、蛍光標識した二次抗体（それぞれ、Alexa568 標識抗ウサギ IgG 抗体及び Alexa488 標識した抗マウス IgG 抗体）で検出した。また、同時に細胞核を DAPI で染色し、β アクチンをファロイジン染色した。蛍光免疫染色像は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。対照として、ベピロビルセン非存在下で HBV 非感染及び感染 PHH を同様に処理した。

HBV 感染 17 日の PHH における HBc 抗原染色強度は HBV 非感染 PHH と比較して高く、Smc6 の染色強度は低かった（図 5 a）。この感染 PHH でみられた Smc6 染色強度の低下は、HBV 感染によって HBx が産生され、機能していることを示している。HBV 非感染 PHH における Smc6 の染色強度を 100%として、HBV 感染 PHH 群（ベピロビルセン非添加及び添加）の染色強度を平準化するとともに、HBV 感染 PHH における HBc 抗原染色強度

Confidential

を 100%として、HBV 非感染 PHH 及びベピロビルセン添加 HBV 感染 PHH 群の染色強度を平準化して図 5 b に示した（それぞれ図 5 b 中において緑及び赤のグラフで示す）。

ベピロビルセンで処理した HBV 感染 PHH における Smc6 染色強度はベピロビルセンの濃度に依存して回復し、HBc 抗原の染色強度はベピロビルセンの濃度に依存して低下したが、いずれの値もベピロビルセンの 512 nM 群でプラトーに達した（この時の Smc6 染色強度は非感染群の 53.0%に回復し、HBc 抗原はベピロビルセン非添加感染群と比較して 46.0%減少した）。このことから、HBV 感染 PHH をベピロビルセンで処理することにより HBc 抗原及び HBx の両方の産生を低下させることが示唆された。いずれの値もベピロビルセンの 512 nM 群でプラトーに達し、それ以上の作用が認められなかったことは、ベピロビルセンの添加前に産生されていた HBc 抗原の代謝回転が遅いこと、HBV 感染によって分解された Smc6 の de novo 発現が遅いことに起因する可能性が考えられる。

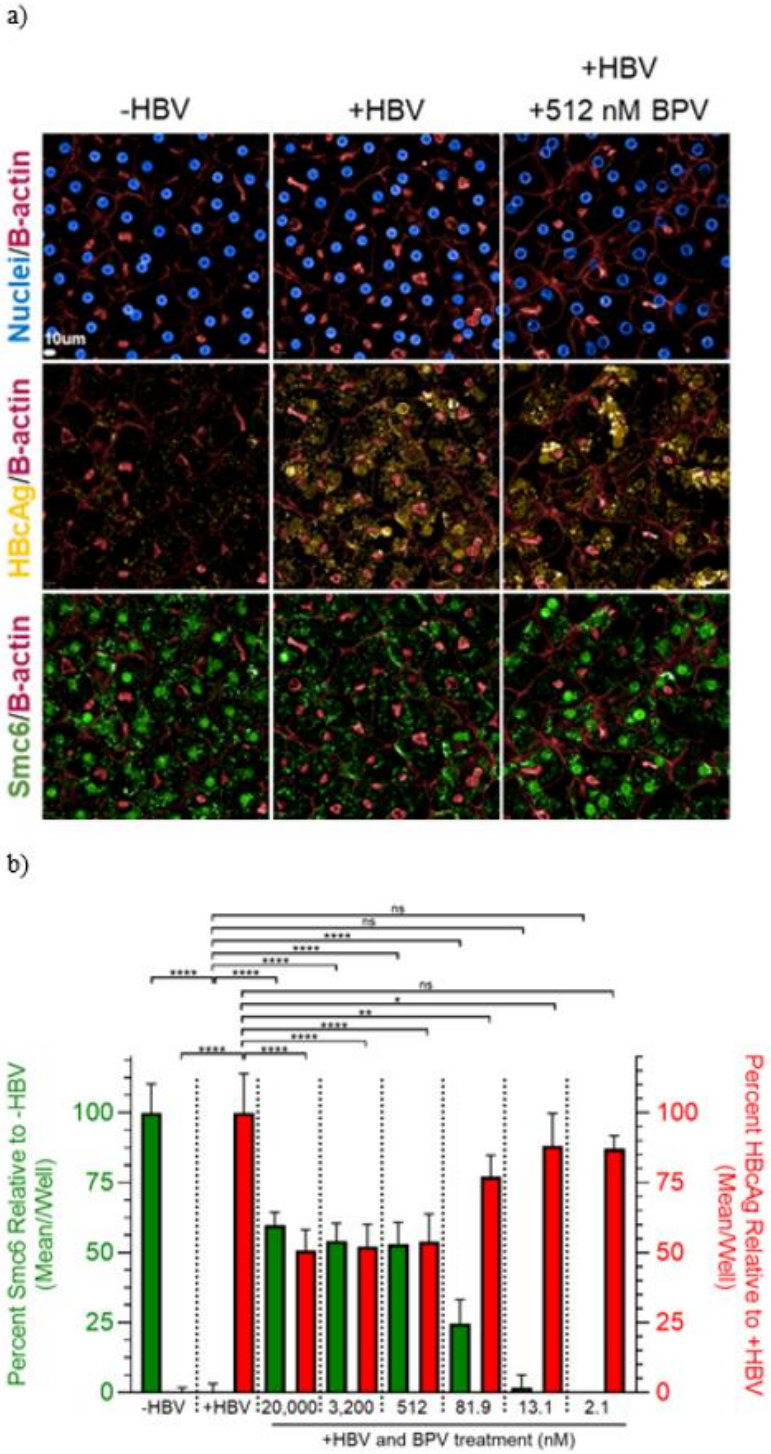
また、PHH に HBV を感染させ、その 3 日後にベピロビルセン（2.1 nM～20 μM）を添加し、14 日間インキュベートしたのち（感染 17 日）、培養上清中の HBs 抗原及び HBe 抗原量（ELISA 法）並びに細胞内 HBV DNA 量（qPCR）を測定した。その結果、培養上清中 HBs 抗原及び HBe 抗原量、並びに細胞内 HBV DNA 量はベピロビルセンの濃度依存的に減少した（図 6 a-c）。

以上のように、HBV 感染 PHH をベピロビルセンで処理することにより、HBs 抗原及び HBe 抗原の産生、並びに HBV DNA 量が減少するとともに、細胞内 HBc 抗原の発現が減少すること、感染によって低下した Smc6 発現が回復すること（HBx 産生阻害のサロゲートマーカー）が示された。このことから、ベピロビルセンは、pgRNA、プレコア mRNA、pre-S1 mRNA、pre-S2/S mRNA 及び X mRNA を含むすべての HBV mRNA を標的とすることによって抗ウイルス活性を示すことが確認された。

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

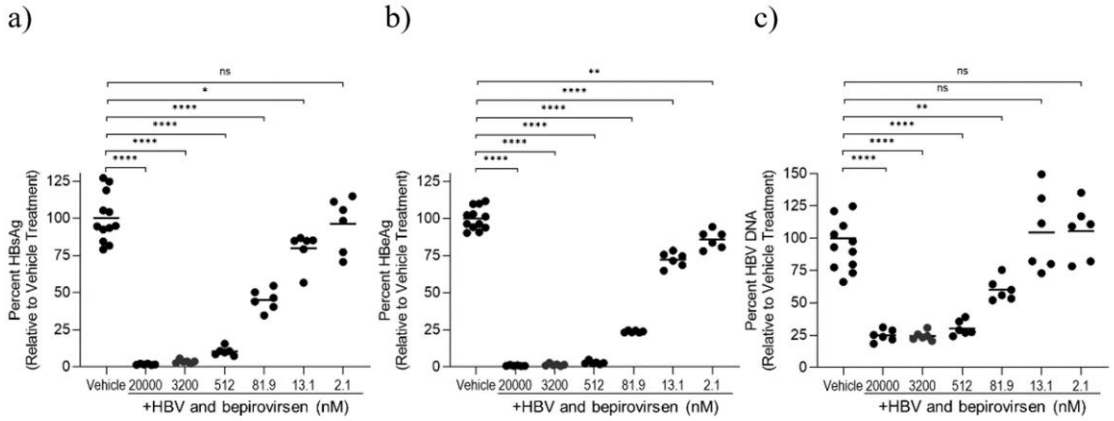
図 5　Bepirovirsen reduced HBcAg and rescued Smc6 expression in infected PHH



Source: m5.3.5.4, GSK Document Number 2025N565074_00 Figure 4 - PHH were infected with HBV (MOI 1 000 GE/cell), treated with bepirovirsen (2.1 to 20 000 nM), and analyzed by IF staining at 14 days post bepirovirsen treatment. (a) IF images of mock-infected (-HBV), HBV-infected (+HBV), and bepirovirsen-treated (512 nM) HBV-infected PHH. Shown are nuclei (blue) and B-actin (red) staining (upper panel), HBcAg (amber) and B-actin (red) staining (middle panel), Smc6 (green) and B-actin (red) staining (lower panel). (b) Percentages of Smc6 levels relative to mock-infected PHH and HBcAg levels relative to HBV-infected PHH. Total nuclei of all wells and all images were analyzed. Bars show mean and SD for 12 or 6 biological replicates of controls or treated, respectively. Adjusted p values: >0.05 (not significant; ns), ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), ≤0.001 (***), <0.0001 (****). BPV = bepirovirsen

Confidential

図 6　Bepirovirsen reduced secretion of HBsAg, HBeAg, and HBV DNA in infected



Source: m5.3.5.4, GSK Document Number 2025N565074_00 Figure 3 - PHH were infected with HBV at MOI 1 000 GE/cell followed by treatment with bepirovirsen at concentrations ranging from 2.1 to 20 000 nM. Percent HBsAg (a), HBeAg (b), and HBV DNA (c) secretion relative to vehicle treated HBV infected PHH were determined at 14 days post bepirovirsen treatment. Each point represents 1 of 12 or 6 biological replicates of vehicle or bepirovirsen-treated HBV-infected PHH, respectively. Adjusted p value >0.05 (not significant; ns), ≤ 0.05 (*), ≤0.01 (**), <0.0001 (****).

4.2.2.B　In vivo 試験

4.2.2.1.B　HBV トランスジェニックマウスにおける HBV 遺伝子産物阻害作用

本試験では、肝臓で HBV の複製がみられる HBV トランスジェニックマウス[Guidotti, 1995]を用いて、血清及び肝臓中の HBV マーカーに対するベピロビルセンの作用を検討した［m5.3.5.4、GSK Document Number 2019N419019_00］。

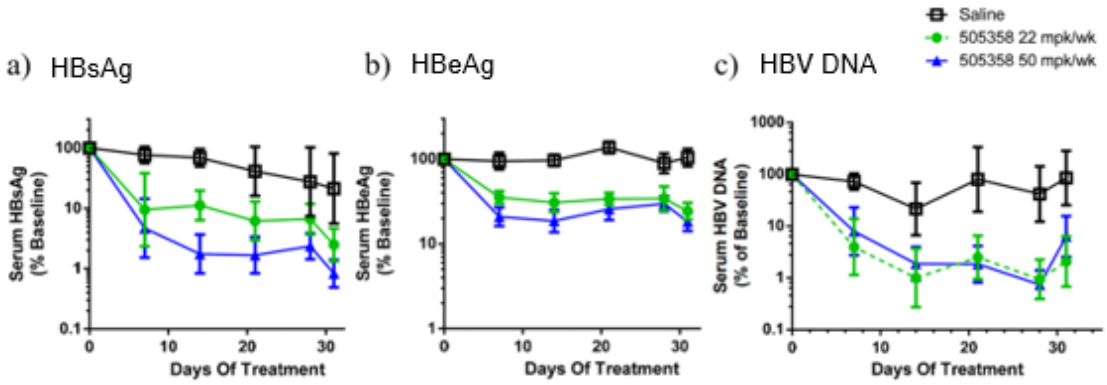
雄の HBV トランスジェニックマウス（n=8/群）にベピロビルセンの 22 及び 50 mg/kg 又は媒体（生理食塩液）を 4 週間（1 週目は週 2 回投与、2～4 週目は週 1 回）皮下投与した。初回投与日を Day 0 とし、Day -3 及び Day 0、並びに Day 7、14、21、28 及び 31 に採血し、血清中 HBs 抗原及び HBe 抗原濃度（ELISA 法）並びに血清中 HBV DNA 量（qPCR）を測定した。また、Day 31 に肝臓を摘出し、組織中 HBV RNA 量（qRT-PCR）、DNA 量（qPCR）を測定するとともに、免疫組織化学染色により HBc 抗原を検出した。

ベピロビルセンの投与により血清中 HBs 抗原及び HBe 抗原濃度の用量依存的な低下がみられ、その作用は Day 7～31 までの試験期間を通して一貫して認められた（図 7 a 及び b）。血清 HBs 抗原及び HBe 抗原濃度は、ベースライン（Day -3 及び Day 0 の平均値）の濃度と比較して、それぞれ最大約 99 及び 80%低下した。血清 HBV DNA 量はベースライン（Day -3 及び Day 0 の平均値）と比較して最大 95%以上減少した（図 7 c）。また、試験終了時点（Day 31）の肝臓中 HBV mRNA 量もベピロビルセンの用量依存的に減少し、ベースライン時の値と比較して最大 90%以上減少した（図 8）。ベピロビルセン投与により、肝臓中 HBV DNA 量も減少した（図は示していない）。免疫組織学的検討において、ベピロビルセン投与により細胞内 HBc 抗原染色強度が顕著に低下することが示された。

以上の結果から、HBV トランスジェニックマウスにベピロビルセンを投与すると肝臓中 HBV mRNA が減少し、それにより血清及び肝臓中の HBV マーカーが減少することが示された。

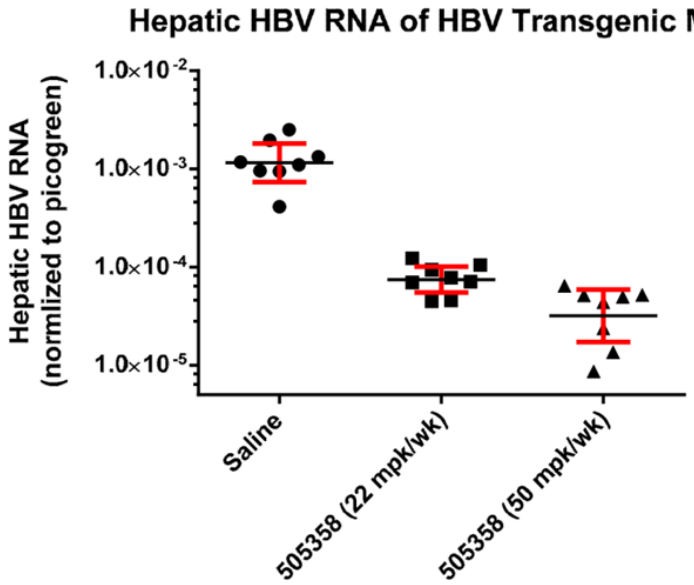
Confidential

図 7　Bepirovirsen reduced serum HBsAg, HBeAg, and HBV DNA in HBV transgenic mice



Source: m5.3.5.4, GSK Document Number 2019N419019_00 Figure 3-5 - Mice were treated with vehicle or bepirovirsen at 22 or 50 mg/kg/wk for 4 weeks. a) HBsAg, b) HBeAg, c) HBV DNA levels in the serum were measured at various times during the experiment. N = 8 mice per group. Data are expressed as geometric mean +/- 95% confidence intervals. 505358 = bepirovirsen

図 8　Bepirovirsen reduced hepatic HBV RNA in HBV transgenic mice



Source: m5.3.5.4, GSK Document Number 2019N419019_00 Figure 1- Mice were treated with vehicle (Saline) or bepirovirsen at 22 or 50 mg/kg/wk. HBV RNA levels in the liver were measured at the end of the experiment on Day 31. N = 8 mice per group. Data are expressed as geometric mean +/- 95% confidence intervals. 505358 = bepirovirsen

4.2.2.2.B　HBV トランスジェニックマウスにベピロビルセン及び ETV を併用投与した時の肝臓 HBV DNA 量に及ぼす影響

本試験では、HBV トランスジェニックマウスを用いてベピロビルセン及び ETV を併用投与した時の有効性を評価した［m5.3.5.4, GSK Document Number 2019N418516_00］。

雌雄 HBV トランスジェニックマウス（n=8/群）にベピロビルセン（0、6、12、25 及び 50 mg/kg、媒体：生理食塩液）を単独で 4 週間投与するか、ベピロビルセン（0、12、25 及

Confidential

び 50 mg/kg、媒体：生理食塩液）と ETV（1 mg/kg、媒体：生理食塩液）を併用で 4 週間投与した。ベピロビルセンは 1 週目は週 2 回投与、2～4 週目は週 1 回皮下投与し、ETV は 3 及び 4 週目に 1 日 1 回経口投与した。最終投与の 6 日後に肝臓を摘出し、組織中 DNA 量（qPCR）を測定した。

ベピロビルセンは肝臓中 HBV DNA 量を用量依存的に減少させた。ベピロビルセンの低用量（6 mg/kg）を単独投与した群では、媒体対照群と比較して肝臓中 HBV DNA 量が約 80%減少した。高用量（50 mg/kg）群では、更に肝臓中 HBV DNA 量が低下し、媒体対照群と比較して 99%減少した。ETV（1 mg/kg）単独投与群では約 80～97%減少した。併用群の肝臓中 HBV DNA 量は ETV 又はベピロビルセン単独群と同程度又は更に減少した。

4.2.3.B　結合部位解析

4.2.3.1.B　結合部位の保存性

本試験では、データベースで公開されている HBV ゲノム配列においてベピロビルセン結合部位が広く保存されているかを調査し、様々な HBV GT に対して有効性を示す可能性について評価した［m 5.3.5.4, GSK Document Number 2024N561961_00］。

HBVdb[Hayer, 2013]に登録されている HBV 配列（9139 配列、2024 年 11 月時点）を用いて、ベピロビルセンの結合部位解析を実施した結果、既知の配列の 97.6%（9139 配列のうち 8919 配列）でベピロビルセンに相補的な配列が保存されていた（表 1）。また、配列の保存性はすべての GT（A～H）で確認された。

ベピロビルセンの結合部位にミスマッチがみられたのは、9139 配列のうち 220 配列で、そのうち 1 塩基のミスマッチ（すなわち SNP）が 195 配列（2.1%）でみられ、2 塩基以上のミスマッチが 25 配列（0.3%）でみられた。一塩基ミスマッチの配列に対してはハイブリダイゼーションできる可能性があることを考慮すると、検討した HBV 配列の 99.7%でベピロビルセンが結合可能な配列が保存されていると考えられる。

SNP は結合部位配列の様々な部位で認められたが、最も高頻度にみられた SNP は、ベピロビルセンの 3'末端から数えて 9 番目の塩基が結合するシトシンのアデニンへの変異（C9A）又は 10 番目の塩基が結合するチミンのグアニンへの変異（T10G）で、それぞれ HBV GT の A 又は D で 1.73 及び 1.47%の配列に認められた（結合部位の配列及びナンバリングについては表 21 参照）。

今回実施した上記の解析よりも小規模なデータセット（約 2900 の HBV ゲノム配列）を用いた解析を以前に実施したが、今回の解析と同様の結果が示されており、98%でベピロビルセンに相補的な配列が保存されていた［m 5.3.5.4, GSK Document Number 2015N239571_00］。

これらの 2 つの結合部位解析結果から、ベピロビルセンの標的はすべての HBV GT に広く保存されていることが示された。

Confidential

表 1　Conservation of bepirovirsen binding site across 9,139 genome sequences of HBV genotypes

Genotype	A	B	C	D	E	F	G	H	RF	Total
Total Sequences	1038	1922	2954	1701	353	296	41	31	803	**9139**
Sequences with 100% identity	1010	1889	2898	1642	340	295	39	30	776	**8919**
Percent coverage (%)	97.3	98.3	98.1	96.5	96.3	99.7	95.1	96.8	96.6	**97.6**

Source: m5.3.5.4, Table modified from GSK Document Number 2024N561961_00 Table 1. Percent coverage represents the percentage of sequences with full sequence complementarity to the bepirovirsen binding site and was calculated by dividing Sequences with 100% identity by Total Sequences.

4.2.3.2.B　結合部位に SNP を有する HBV 変異株に対するベピロビルセンの感受性

4.2.3.2.1.B　ベピロビルセンに対する感受性に影響を及ぼす変異のスクリーニング

HBV RNA Launch System（抗ウイルス薬に対する耐性をもたらす変異を検討するための HBV 細胞培養系）を用い、ベピロビルセンに対する感受性を変化させる HBV 配列バリアントを同定した［m 5.3.5.4, GSK Document Number 2021N491812_00］。HBV RNA Launch System は、HBV DNA 発現プラスミドを用いず、HBV ウイルス pgRNA を細胞にトランスフェクトした HBV 培養システムであるため、複製された HBV DNA ゲノムをバックグラウンドノイズフリーな状態でシーケンシングすることが可能である[Yu, 2023]。

本試験では、Deep Mutational Scanning の手法を用い、ベピロビルセンの結合部位又は結合部位を含む周辺領域に網羅的に変異を導入した 3000～4000 の変異体を含む 2 種類のライブラリ（3N 及び 5N ライブラリ）を構築した。3N ライブラリは、ベピロビルセン結合部位を中心とする領域（84 塩基）に連続した 3 塩基変異を網羅的に導入し、5N ライブラリはベピロビルセン結合部位（20 塩基）に連続した 5 塩基変異を網羅的に導入した。これらのライブラリをベピロビルセン又はベピロビルセンの配列と無関係な ASO 存在下でスクリーニングし、ベピロビルセン存在下で濃縮される変異を同定した。すなわち、pgRNA とベピロビルセンを同時に細胞にトランスフェクトした時に複製される HBV DNA ゲノムの配列を解析し、ベピロビルセンの配列と無関係な ASO をトランスフェクトした時の配列と比較した。

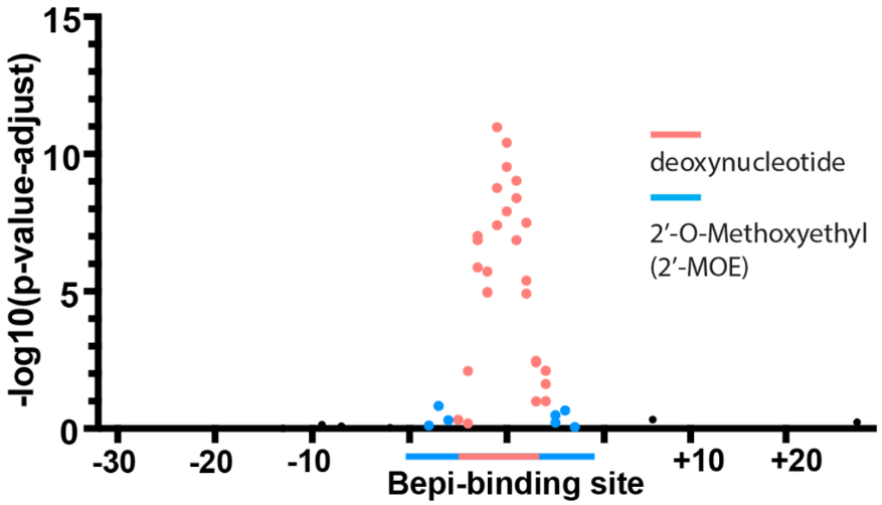
その結果、ベピロビルセン処理により、ベピロビルセンに対する感受性が低下した変異が濃縮され、多くのゲノム配列で 3 つ以上の変異が認められたが、一部では単一変異及び二重変異を有する変異体も同定された。変異はベピロビルセン結合部位（20 塩基）全体で同定されたが、2'-MOE 修飾しているウイング領域よりも配列中央部分（ギャップ領域）に結合する部位で多く認められたことから（図 9、3N ライブラリを用いた結果を示す）、ギャップ領域の変異が感受性の低下に関連することが示唆された。

ベピロビルセン存在下で濃縮される一塩基変異として、C9A が同定された（ベピロビルセンの 3'末端から数えて 9 番目の塩基が結合するシトシンがアラニンに変異）［HBV ゲノム内のベピロビルセン結合部位（20 塩基）の配列及びナンバリングは図 10 a に示す］。C9A は、公開されている HBV ゲノムデータベースにおいても、HBV GT の A の配列において最も高頻度に同定され（1.73%）（Section 4.2.3.1.B）、B-Clear 試験でベピロビルセン結合部位

Confidential

の多型として最も高頻度に認められた変異である（Section 4.3.5.B）。そこで、別途 C9A 変異株を作製し、pgRNA をトランスフェクトした細胞から分泌される HBs 抗原量に対するベピロビルセンの抑制作用を検討したところ、C9A 変異株を用いた検討における HBs 抗原抑制作用の EC50 は、野生型に対する EC50 の 4.7 倍高値であり、ベピロビルセンに対する感受性の低下が認められた。この結果は、HBV RNA Launch System においてベピロビルセンに対して部分耐性となる可能性のある変異として C9A が同定されたことを支持するものであった。

図 9　Screening of mismatch pgRNA libraries in the presence of bepirovirsen leads to enrichment of mutations in the center of the ASO binding site in the RNA launch system



Source: m5.3.5.4, GSK Document Number 2021N491812_00 Figure 7a- EdgeR was used to compare the difference in nucleotide distributions between triplicate HBV pgRNA 3N libraries selected with an irrelevant control ASO or bepirovirsen (Bepi). P-values of all nucleotides along the randomized region that are not WT were used to show the significance of mutations enriched in the presence of bepirovirsen. 'Wing' region of bepirovirsen that have a 2'-MOE modification are shown in cyan and those in 'Gapmer' region that have the deoxy nucleotides are shown in red. Nucleotides of the bepirovirsen binding site pgRNA sequence are shown in the same color scheme. X-axis indicates the nucleotide position relative to the bepirovirsen binding site in the HBV genome.

4.2.3.2.2.B　ベピロビルセン結合部位に SNP を有するウイルスの表現型評価

B-Clear 試験では、少数例ではあるもののベピロビルセン結合部位に SNP が検出された（Section 4.3.5.1.B）。そのうち、11 種類の SNP（G1A、C2T、G8A、C9A、C9T、T10A、T10C、T10G、A13G、C15T 及び C20T）を in vitro での適応度（複製能）評価に供した。また、データベースで公開されている HBV ゲノム配列でみられた SNP である C7A 及び A13C も検討に供した［m 5.3.5.4, GSK Document Number 2015N239571_00、2024N561961_00］。対照には 2 塩基（C9A/T10G）又は 8 塩基変異を有する変異体を用いた。変異体の名称はベピロビルセンの 3'末端から数えて何番目に SNP があるかで表した（すなわち、G1A はベピロビルセンの 3'末端から数えて 1 番目のグアニンがアラニンに変異している変異体であるが、HBV ゲノム上では 1581 番目の塩基に該当する；対応表は図 10 a 又は付録の表 21 を参照）。

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

ベピロビルセン結合部位に SNP を有する HBV プラスミドをヒト肝癌由来細胞株 HepG2 に導入してウイルスストックを作製したのち、PHH に感染させ、21～22 日後に培養上清中に分泌された HBs 抗原量を測定することによって HBV 変異株の適応度（複製能）を評価した［m 5.3.5.4, GSK Document Number 2023N540221_01］。野生型の HBs 抗原分泌量を 100%として、変異株の適応度を HBs 抗原分泌量に応じて低・中・高の 3 段階に分類した（低：20%未満、中：20～60%、高：60%超）。その結果、適応度が低い変異株は G1A 及び C7A、中程度であった変異株は G8A、C9T、A13C、A13G 及び C15T、高い変異体は C2T、C9A、T10A、T10C、T10G 及び C20T であった（図 10 b）。低～中の適応度であった大部分の変異株では、HBx にアミノ酸変異がみられたが、ポリメラーゼのアミノ酸配列には影響がみられなかった。8 塩基に変異を導入した HBV（HBs 抗原分泌量は野生型の 0.5%）及び A13C/G（HBs 抗原分泌量は野生型の 22.0～25.6%）等の一部の変異株では、HBx にアミノ酸変異あり／ポリメラーゼにアミノ酸変異なしであったが、DR2 領域にもアミノ酸変異がみられたことから、これが適応度に影響を及ぼしている可能性も考えられた。検討した変異株で最も適応度が低かった G1A（HBs 抗原分泌量は野生型の 3.4%）では、HBx のアミノ酸にのみ変異がみられ、ポリメラーゼ又は DR2 領域のアミノ酸配列には影響がみられなかったことから、この HBx の単一アミノ酸の変異が HBx 機能を阻害し、それによって HBs 抗原の産生を顕著に低下させた（複製能を低下させた）可能性が示唆された。

続いて、ベピロビルセンの感受性を検討するに当たり、上記の適応度評価の結果（適応度が中～高）、結合部位内の SNP の位置、B-Clear 試験でベースラインにみられた頻度及びベピロビルセン投与後に検出された SNP であるか（Section 4.3.5.B）等を考慮し、6 種類の SNP（G8A、C9A、T10A、T10G、C15T 及び C20T）を選択した。G1A、C2T、C7A、C9T、T10C、A13C 及び A13G は、適応度及び／又は発現頻度が低いこと、あるいは同じ位置で他の SNP を検討している（C9 及び T10）ことから検討対象に含めなかった。

HBV 変異株及び野生型 HBV を PHH に感染させ、7 日後にベピロビルセン（0.00084～20 μM）を添加して 15 日インキュベートしたのち（感染 22 日）、分泌された HBs 抗原及び HBe 抗原量を ELISA 法により定量した（n=2）。その結果、検討したすべての HBV 変異株感染 PHH から分泌される HBs 抗原及び HBe 抗原量はベピロビルセンの濃度依存的に低下したが、野生型と比較するとその作用は弱く、HBV 変異株ではベピロビルセンに対する感受性の低下が認められた。各 HBV 変異株感染 PHH における HBs 抗原及び HBe 抗原分泌抑制作用の EC50 を算出し、EC50 の変化倍率（変異株における EC50／野生型における EC50）を算出したところ、ベピロビルセンの配列中央部分（ギャップ領域）が結合する部位に SNP（G8A、C9A 、T10A、T10G 及び C15T）を有する変異株における EC50 の変化倍率は 1.8～4.1（HBs 抗原）及び 1.8～3.6（HBe 抗原）であった（表 2）。これに対し、2’-MOE 修飾しているウイング領域末端の C20T を有する変異株における EC50 の変化倍率は 1.2（HBs 抗原）及び 1.6（HBe 抗原）であり、ギャップ領域に SNP を有する変異株における変化倍率よりも低値であった。ベピロビルセンに対する感受性が最も低下した変異株は C9A であった（EC50 の変化倍率は、HBs 抗原で 4.1 及び HBe 抗原で 3.6）が、この変異株の適応度は野生型 HBV と同程度（HBs 抗原及び HBe 抗原分泌量はそれぞれ野生型の 95.1 及び 117.4%）で

Confidential

あった（表 2）。臨床試験でベピロビルセン結合部位に検出された SNP については、臨床ウイルス学の項（Section 4.3.B）で考察する。

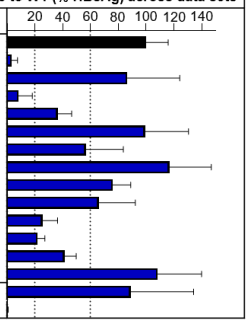
図 10　Relative position of the bepirovirsen binding site nucleotides 1-20 in the HBV genome and pooled analysis of HBV variants fitness across multiple datasets

a)

Nucleic acid	Position in bepirovirsen binding site	Position of bepirovirsen binding site in HBV genome
G	1	1581
C	2	1582
A	3	1583
C	4	1584
T	5	1585
T	6	1586
C	7	1587
G	8	1588
C	9	1589
T	10	1590
T	11	1591
C	12	1592
A	13	1593
C	14	1594
C	15	1595
T	16	1596
C	17	1597
T	18	1598
G	19	1599
C	20	1600

b)

SNP	Nucleotide sequence 2'MOE	Gapmer	2'MOE	Amino acid sequence HBx	Pol	Fitness relative to WT (% HBsAg) across data sets % HBsAg±SD
WT	GCACT	TCGCTTCACC	TCTGC	ALRFTSA	HFASPLH	100.0±16.1
G1A	ACACT	TCGCTTCACC	TCTGC	TLRFTSA	HFASPLH	3.4±4.1
C2T	GTACT	TCGCTTCACC	TCTGC	VLRFTSA	YFASPLH	86.7±37.7
C7A	GCACT	TAGCTTCACC	TCTGC	ALSFTSA	HLASPLH	8.3±9.8
G8A	GCACT	TCACTTCACC	TCTGC	ALHFTSA	HFTSPLH	36.7±9.9
C9A	GCACT	TCGATTCACC	TCTGC	ALRFTSA	HFDSPLH	99.3±31.4
C9T	GCACT	TCGTTTCACC	TCTGC	ALRFTSA	HFVSPLH	56.7±27.2
T10A	GCACT	TCGCATCACC	TCTGC	ALRITSA	HFASPLH	117.2±29.9
T10C	GCACT	TCGCCTCACC	TCTGC	ALRLTSA	HFASPLH	76.1±12.9
T10G	GCACT	TCGCGTCACC	TCTGC	ALRVTSA	HFASPLH	66.0±26.5
A13C	GCACT	TCGCTTCCCC	TCTGC	ALRFPSA	HFASPLH	25.6±10.9
A13G	GCACT	TCGCTTCCGC	TCTGC	ALRFASA	HFASPLH	22.0±5.2
C15T	GCACT	TCGCTTCACT	TCTGC	ALRFTSA	HFASLLH	41.4±8.5
C20T	GCACT	TCGCTTCACC	TCTGT	ALRFASV	HFASPLY	108.6±31.5
C9A/T10G	GCACT	TCGACGTCACC	TCTGC	ALRVTSA	HFESPLH	89.0±45.2
MM	GCATT	TTGCAAGCCCA	CTAC	AFCKPTT	HFASPLH	0.5±0.3



Source: m5.3.5.4, GSK Document Number 2023N540221_01 Appendix Figure 1 – a) The relative position of the bepirovirsen binding site nucleotides 1-20 within the HBV genome. Position in the bepirovirsen binding site and within the HBV genome are used interchangeably throughout this document. b) Mean and SD of percent HBsAg secretion relative to HBV WT across multiple data sets for HBV variants identified in B-Clear and public databases. The number of data sets varied: 4 sets (G1A, C2T, G8A, A13G, C15T), 6 sets (C7A, C9T, A13C, MM), 8 sets (T10A, C20T, C9A/T10G), and 10 sets (WT, C9A, T10G). C9A/T10G and MM were assay control variants with more than 1 nucleotide mismatch that were not identified in B-Clear. Dotted lines in bar graph indicate low fitness (<20% HBsAg relative to WT), mid fitness (20-60% HBsAg relative to WT), and HBV WT comparable fitness (>60% HBsAg relative to WT). Nucleotide and amino acid changes are indicated in purple.

Confidential

表 2 Summary table: HBV WT and variants relative fitness, Imax, EC50, and reduced susceptibility – HBsAg and HBeAg

		Clinically Identified HBV Variants							Assay ctrl.
	HBV name	WT	G8A	C9A	T10A	T10G	C15T	C20T	C9A/T10G
	SNP position	NA	G1588A	C1589A	T1590A	T1590G	C1595T	C1600T	NA
HBsAg	% Fitness Relative to WT	100±12.4	34.2±4.7	95.1±10.9	113.1±11.4	61.7±7.7	38.0±3.4	99.6±11.3	65.1±8.8
	Abs. EC50 (nM) DRC1	47.57	124.4	210.95	79.87	154.62	101.61	62.99	354.66
	Abs. EC50 (nM) DRC2	46.62	141.85	176.73	90.81	131.31	111.5	53.39	717.83
	AVG Abs. EC50 (nM)	47.1±0.7	133.1±12.3	193.8±24.2	85.3±7.7	143.0±16.5	106.6±7.0	58.2±6.8	536.2±256.8
	Imax (% inhibition over vehicle at 20µM)	99.5±0.5	93.9±0.9	86.2±1.0	97.4±0.6	94.4±1.0	96.9±1.3	99.0±0.6	73.7±2.8
	AVG Reduced Susceptibility	NA	2.8±0.3	4.1±0.5	1.8±0.2	3.0±0.3	2.3±0.2	1.2±0.1	11.4±5.6
HBeAg	% Fitness Relative to WT	100±27.1	31.8±7.5	117.4±24.0	121.8±15.2	81.5±16.2	35.3±5.7	139.4±30.1	75.8±16.4
	Abs. EC50 (nM) DRC1	27.77	48.45	102.75	45.20	69.57	53.66	46.47	110.43
	Abs. EC50 (nM) DRC2	31.80	67.18	110.23	60.16	86.64	58.08	47.03	133.75
	AVG Abs. EC50 (nM)	29.8±2.9	57.8±13.2	106.5±5.3	52.7±10.6	78.1±12.1	55.9±3.1	46.7±0.4	122.1±16.5
	Imax (% inhibition over vehicle at 20µM)	100.8±0.9	99.0±0.5	97.7±1.1	99.4±0.3	98.0±1.9	99.3±0.6	100.3±0.8	91.0±1.6
	AVG Reduced Susceptibility	NA	1.9±0.3	3.6±0.2	1.8±0.2	2.6±0.2	1.9±0.1	1.6±0.1	4.1±0.2

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

Source: m5.3.5.4, Table modified from GSK Document Number 2023N540221_01 Table 4. Dose response analysis was conducted to assess the susceptibility of each HBV variant to bepirovirsen. Values for AVG reduced susceptibility indicate EC50 fold change relative to HBV WT. Percent Imax of HBsAg and HBeAg was determined at the highest tested bepirovirsen dose of 20µM.

Confidential

4.3.B　臨床ウイルス学

4.3.1.B　臨床ウイルス学に関する目的

各試験［第 2a 相試験である 205695 試験（Section 4.3.9.1.B）を除く］のウイルス学に関する目的を以下に示す。

- HBV GT 並びにベースライン及びベースライン後の配列多型がウイルス学的効果に及ぼす影響を評価する。
- ベピロビルセン投与中及び投与後に、HBV ゲノム内のベピロビルセン結合部位及びその他の部位に発現する多型を特定し、多型がウイルス学的効果に及ぼす影響を評価する。
- 探索的なウイルス学的バイオマーカー（HBV RNA 及び HBcr 抗原）とウイルス学的効果の関係を記述する。

また、B-Fine 試験（Section 4.3.8.1.3.B）では肝臓の FNA を実施し、肝細胞での HBV を評価した。

4.3.2.B　検体及び方法

4.3.2.1.B　ウイルス学的解析の対象集団

各試験に組み入れられたすべての被験者を、ウイルス耐性、HBV RNA 及び HBcr 抗原に関する解析対象集団に含めた。HBV 耐性モニタリング基準に該当した検体のうち、少なくともすべてのベースライン検体及び一部のベースライン後の検体について、ウイルスのシーケンシングを実施した［205695 試験（Section 4.3.9.2.2.B）を除く］。HBV 耐性モニタリング基準の定義は、以下に該当する臨床検査結果が 2 回連続して確認された場合とした。

- HBV DNA 量又は HBs 抗原量の nadir から≥1 $\log_{10}$ の上昇、又は
- HBV DNA 量又は HBs 抗原量の LLOQ 未満からの定量可能な濃度への上昇、又は
- HBV DNA 量又は HBs 抗原量が一度も LLOQ 未満に達しない
- HBV DNA 量>1000 IU/mL（B-Well 1 試験、B-Well 2 試験及び B-Sure 試験での定義）

一部の評価時点で、探索的なウイルス学的バイオマーカー（HBcr 抗原及び HBV RNA）を測定した。また、HBV RNA シーケンシングの実施を可能にするため、前述の HBV 耐性モニタリング基準に該当した追加検体に対して HBV RNA を測定した。

4.3.2.2.B　塩基配列及び遺伝子型の解析方法

HBV DNA 量が>1000 IU/mL であった臨床検体を対象に、全ゲノム DNA の NGS を実施した［205695 試験（Section 4.3.9.2.2.B）を除く］。検体の HBV DNA 量が≤1000 IU/mL であった場合、又は全ゲノム DNA の NGS が失敗した場合は、qRT-PCR で測定した HBV RNA 量に応じて、HBV RNA/DNA から増幅された RT 及び／又は X 蛋白質コード領域を包含する部分配列に対し NGS を実施した。HBV ゲノム内の多型の特定のため、NGS のリードをトリミング及びフィルタリングし、最も類似性の高い GT の参照配列にマッピングした。HBV GT の特定には、以下に示す優先順位（番号）に従い、利用可能な方法を用いた。

1. HBV DNA シーケンシング

Confidential

2. 治験責任（分担）医師から報告された既往歴
3. HBV RNA シーケンシング
4. HBs 抗原血清型分類

その後、遺伝子型を相互に比較するため、標準的な GT A の参照配列（X02763）にマッピングした。アレル頻度が非特異的バックグラウンド（5%）を上回る場合、多型として解析した。このうちベースラインではアレル頻度が<5%であった多型をベピロビルセン投与後に発現した多型とみなした。

4.3.2.3.B 探索的なウイルス学的バイオマーカー（HBV RNA 量及び HBcr 抗原量の定量）の解析方法

HBcr 抗原量の測定には、化学発光酵素免疫測定法を用いた。HBV RNA 量の測定には、全長 HBV RNA を標的とした qRT-PCR アッセイを用いた。

4.3.3.B B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験

B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験は、NA 治療を受けている HBV 持続感染患者を対象に、ベピロビルセンを 24 週間投与した時の有効性及び安全性を評価する、第 3 相、多施設共同、ランダム化、二重盲検試験であった。主要目的は、NA 治療中かつベースラインの HBs 抗原量≤3000 IU/mL の HBV 持続感染患者にベピロビルセンを 24 週間投与（負荷投与を含む）した時の治療効果（FC の達成）を評価することであった。

両試験のデザインは基本的に同一であり、（1）二重盲検投与期（Week 1～24）、（2）NA 単独治療期（Week 25～48）、（3）NA 治療中止期又は NA 単独治療継続期（Week 49～72）、及び（4）持続性評価期（Week 73～96）の 4 つの期間で構成された。

臨床ウイルス学の中間解析報告書では、最後に組み入れられた被験者の Week 48 来院までの HBV 耐性及び探索的ウイルスマーカーを評価した。この時点で、多くの被験者は Week 72 来院に到達していた。特に記載のない限り、いずれの解析もベースラインの HBs 抗原量≤3000 IU/mL の被験者集団を対象とした。ウイルス耐性の解析には Safety 集団を用い、新規ウイルスマーカーの解析には Full Analysis Set を用いた。本項では、各試験の解析及び両試験の併合解析から得られた結果を要約した（m5.3.5.4, B-Well 1 VSR, B-Well 2 VSR、m5.3.5.3, ISE）。

4.3.3.1.B HBV 耐性モニタリング基準

HBV 耐性モニタリング基準の詳細を Section 4.3.2.1.B に示した。これらの基準は、臨床的有効性を評価するために治験実施計画書で規定されたウイルス学的再発及び臨床的再発の基準とは異なるものであった（m5.3.5.1, B-Well 1 CSR Protocol Amendment, B-Well 2 CSR Protocol Amendment）。

NA 治療及びベピロビルセン投与によるウイルス抑制のため、HBV DNA 量に基づく HBV 耐性モニタリング基準に該当する被験者は少なかった（表 3）。HBV DNA 量>1000 IU/mL（HBV DNA 全ゲノムシーケンシングの最小閾値）であった被験者はわずかであり、当該被験者の割合はベピロビルセン群で<1%、プラセボ群で 2%であった。

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

多くの被験者は、HBs 抗原量データに基づく HBV 耐性モニタリング基準に該当した。HBs 抗原量の基準に該当した検体に対して HBV シーケンシングを試みたが、これらの検体から HBV DNA 又は RNA が検出されなかったため、シーケンシングの成功例は限られた。

Confidential

表 3　Number of participants who met HBV resistance monitoring criteria

	B-Well 1		B-Well 2		Pooled studies	
Criteria	Placebo (N=326) n (%)	Bepirovirsen (300mg+LD) (N=652) n (%)	Placebo (N=285) n (%)	Bepirovirsen (300mg+LD) (N=571) n (%)	Placebo (N=611) n (%)	Bepirovirsen (300mg+LD) (N=1223) n (%)
Any HBV DNA criteria	10 (3%)	31 (5%)	7 (2%)	37 (6%)	17 (3%)	68 (6%)
HBV DNA >1000 IU/mL	6 (2%)	6 (<1%)	4 (1%)	5 (<1%)	10 (2%)	11 (<1%)
Confirmed ≥1 log10 increase in HBV DNA after being LLOQ or TND	2 (<1%)	4 (<1%)	2 (<1%)	2 (<1%)	4 (<1%)	6 (<1%)
Confirmed HBV DNA quantifiable after being LLOQ	8 (2%)	30 (5%)	6 (2%)	36 (6%)	14 (2%)	66 (5%)
Any HBsAg criteria	326 (100%)	502 (77%)	284 (>99%)	462 (81%)	610 (>99%)	964 (79%)
Never achieved HBsAg not detected by EOT	326 (100%)	332 (51%)	284 (>99%)	308 (54%)	610 (>99%)	640 (52%)
Confirmed HBsAg quantifiable after being undetected	4 (1%)	215 (33%)	1 (<1%)	201 (35%)	5 (<1%)	416 (34%)
Confirmed >1 log10 increase in HBsAg for timepoint following nadir visit	6 (2%)	21 (3%)	3 (1%)	15 (3%)	9 (1%)	36 (3%)

Source: Module 5.3.5.3, ISE Table 2.1062. Denominator is N for each category.

Confidential

4.3.3.2.B HBV シーケンシング

NA 治療によるウイルス抑制のため、ベースラインで HBV シーケンシングデータが得られた被験者は少なく、ベースラインと対応するデータがベースライン後に得られた被験者は更に少なかった（表 4）。ベースラインでシーケンシングデータが得られた被験者の割合はベピロビルセン群（19%）及びプラセボ群（20%）で同程度であったが、ベースライン後にシーケンシングデータが得られた被験者の割合はベピロビルセン群（6%）と比較してプラセボ群（15%）で高かった。

表 4 Number of participants with HBV sequences available at Baseline and post-Baseline

	B-Well 1		B-Well 2		Pooled studies	
Number of participants with	Placebo (N=326)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=652)	Placebo (N=285)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=571)	Placebo (N=611)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=1223)
Baseline HBV sequence, n (%)	67 (21%)	123 (19%)	53 (19%)	104 (18%)	120 (20%)	227 (19%)
Paired Post-Baseline HBV sequence, n (%)	53 (16%)	42 (6%)	39 (14%)	31 (5%)	92 (15%)	73 (6%)

Source: Module 5.3.5.3, ISE Table 2.1053; n = number of people with sequence available in each category; N = denominator for determination of percentages.

4.3.3.3.B HBV 遺伝子型解析

B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験の併合解析データから、最も多くの被験者で検出された HBV GT は C であり、次いで D、B 及び A の順に多かった（表 5）。各 GT の被験者数及び割合は、試験間及び治療群間（プラセボ群及びベピロビルセン群）で同程度であった。

表 5 HBV Genotype distribution in B-Well 1 and 2 participants

	B-Well 1		B-Well 2		Pooled studies	
HBV Genotype	Placebo (N=326) n (%)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=652) n (%)	Placebo (N=285) n (%)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=571) n (%)	Placebo (N=611) n (%)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=1223) n (%)
A	24 (7%)	70 (11%)	39 (14%)	56 (10%)	63 (10%)	126 (10%)
B	80 (25%)	164 (25%)	74 (26%)	144 (25%)	154 (25%)	308 (25%)
C	104 (32%)	196 (30%)	92 (32%)	182 (32%)	196 (32%)	378 (31%)
D	93 (29%)	164 (25%)	62 (22%)	155 (27%)	155 (25%)	319 (26%)
E	6 (2%)	13 (2%)	6 (2%)	6 (1%)	12 (2%)	19 (2%)
F	1 (<1%)	3 (<1%)	1 (<1%)	0	2 (<1%)	3 (<1%)
G	0	1 (<1%)	0	0	0	1 (<1%)
H	0	2 (<1%)	0	0	0	2 (<1%)
I	1 (<1%)	3 (<1%)	0	0	1 (<1%)	3 (<1%)
J	0	1 (<1%)	0	0	0	1 (<1%)
Other	16 (5%)	33 (5%)	6 (2%)	20 (4%)	22 (4%)	53 (4%)
Missing	1 (<1%)	2 (<1%)	5 (2%)	8 (1%)	6 (<1%)	10 (<1%)

Source: Module 5.3.5.3, ISE Table 2.1048; N = Denominator for each category.

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

GT 判定の対象となる被験者集団は NA 治療を受けているため、ベースラインの HBV DNA 量がシーケンシングに必要な基準を下回り、HBV GT 判定の標準法である HBV DNA 全ゲノムシーケンシングを実施できなかった。そのため、GT の判定には既往歴、HBV の部分配列シーケンシング及び HBs 抗原血清型分類等の代替の情報を用いた。これらの結果は、HBV DNA シーケンシングのみを用いた場合の結果と異なる可能性がある（m5.3.5.4, B-Well 1 VSR, B-Well 2 VSR）。

4.3.3.4.B　ベースラインでのベピロビルセン結合部位の多型

ベースラインで HBV シーケンシングデータが得られた被験者のうち、多くの被験者［ベピロビルセン群 213/227 例（94%）及びプラセボ群 105/120 例（88%）］でベピロビルセン結合部位に野生型配列が認められた（表 6）。ベースラインでベピロビルセン結合部位に多型が認められた被験者はベピロビルセン群及びプラセボ群ともに少なく、それぞれ 14/227 例（6%）及び 15/120 例（13%）であった。ベースラインで最も多く認められた結合部位の多型は C1589A であり、ベピロビルセン群 4 例及びプラセボ群 1 例に認められた。

いずれの試験でも、ベースラインで HBs 抗原量≤1000 IU/mL かつベピロビルセン結合部位に多型が認められた被験者は少なかった（表 6）。ベースラインで認められたベピロビルセン結合部位多型は 14 種類であった。

表 6　Participants with bepirovirsen binding site polymorphisms at Baseline

	B-Well 1		B-Well 2		Pooled studies	
Number of participants with	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)
Overall population						
Baseline sequence, N	67	123	53	104	120	227
Wild type binding site, n (%)	58 (87%)	116 (94%)	47 (89%)	97 (93%)	105 (88%)	213 (94%)
Any binding site polymorphism, n (%)	9 (13%)	7 (6%)	6 (11%)	7 (7%)	15 (13%)	14 (6%)
G1581A, n (%)	1 (1%)	0	0	0	1 (<1%)	0
A1583G, n (%)	0	1 (<1%)	0	0	0	1 (<1%)
A1583T, n (%)	0	1 (<1%)	0	0	0	1 (<1%)
C1584T, n (%)	1 (1%)	0	0	0	1 (<1%)	0
T1585C, n (%)	0	0	1 (2%)	0	1 (<1%)	0
C1587T, n (%)	2 (3%)	0	1 (2%)	1 (<1%)	3 (3%)	1 (<1%)
G1588A, n (%)	1 (1%)	0	0	0	1 (<1%)	0
G1588T, n (%)	0	0	0	1 (<1%)	0	1 (<1%)
C1589A, n (%)	1 (1%)	2 (2%)	0	2 (2%)	1 (<1%)	4 (2%)
T1590C, n (%)	1 (1%)	0	1 (2%)	0	2 (2%)	0
A1593C, n (%)	0	1 (<1%)	0	0	0	1 (<1%)
A1593G, n (%)	0	0	1 (2%)	0	1 (<1%)	0
T1596A, n (%)	0	0	1 (2%)	0	1 (<1%)	0
T1596C, n (%)	0	1 (<1%)	0	0	0	1 (<1%)
C1597DEL, n (%)	0	0	0	1 (<1%)	0	1 (<1%)
T1598C, n (%)	0	1 (<1%)	0	0	0	1 (<1%)
T1598DEL, n (%)	0	0	0	1 (<1%)	0	1 (<1%)

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

	B-Well 1		B-Well 2		Pooled studies	
Number of participants with	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)
G1599A, n (%)	0	1 (<1%)	0	1 (<1%)	0	2 (<1%)
G1599DEL, n (%)	0	0	0	1 (<1%)	0	1 (<1%)
C1600T, n (%)	2 (3%)	0	1 (2%)	1 (<1%)	3 (3%)	1 (<1%)
Participants with Baseline HBsAg ≤1000 IU/mL						
Baseline sequence, N	42	69	29	50	-	-
Wild type binding site, n (%)	35 (83%)	67 (97%)	26 (90%)	44 (88%)	-	-
Any binding site polymorphism, n (%)	7 (17%)	2 (3%)	3 (10%)	6 (12%)	-	-
G1581A, n (%)	1 (2%)	0	0	0	-	-
A1583G, n (%)	0	1 (1%)	0	0	-	-
C1584T, n (%)	1 (2%)	0	0	0	-	-
C1587T, n (%)	2 (5%)	0	0	1 (2%)	-	-
G1588T, n (%)	0	0	0	1 (2%)	-	-
C1589A, n (%)	0	1 (1%)	0	2 (4%)	-	-
T1590C, n (%)	1 (2%)	0	1 (3%)	0	-	-
A1593C, n (%)	0	1 (1%)	0	0	-	-
A1593G, n (%)	0	0	1 (3%)	0	-	-
T1596A, n (%)	0	0	1 (3%)	0	-	-
C1597DEL, n (%)	0	0	0	1 (2%)	-	-
T1598DEL, n (%)	0	0	0	1 (2%)	-	-
G1599DEL, n (%)	0	0	0	1 (2%)	-	-
C1600T, n (%)	2 (5%)	0	0	1 (2%)	-	-

Source: Module 5.3.5.3, ISE Table 2.1053, and Module 5.3.5.4, B-Well 1 and 2 Virology Study Reports Tables 10.
Note: Denominator is N, number of participants with HBV sequences. Participants may have more than one polymorphism. A ≥ 5% allelic frequency threshold hold was used to report polymorphisms. "-" data not available.

各 GT の被験者数及び割合に、ベースラインの多型別の顕著な傾向は認められなかった（表 7）。

Confidential

表 7　Summary of Baseline bepirovirsen binding site polymorphisms by HBV Genotype in pooled B-Well 1 and B-Well 2 studies

	HBV Genotype									
Number of participants with	A n (%)	B n (%)	C n (%)	D n (%)	E n (%)	F n (%)	G n (%)	H n (%)	I n (%)	J n (%)
Placebo, N=120										
G1581A	0	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0
C1584T	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0	0
T1585C	0	0	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0
C1587T	1 (<1%)	0	0	2 (2%)	0	0	0	0	0	0
G1588A	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0	0
C1589A	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T1590C	0	1 (<1%)	0	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0
A1593G	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T1596A	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0	0
C1600T	0	0	2 (2%)	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0
Bepirovirsen (300 mg+LD), N=227										
A1583G	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (<1%)	0
A1583T	0	0	0	0	0	1 (<1%)	0	0	0	0
C1587T	0	0	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0
G1588T	0	0	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0
C1589A	1 (<1%)	1 (<1%)	1 (<1%)	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0
A1593C	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (<1%)	0
T1596C	0	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0
C1597DEL	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T1598C	0	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0
T1598DEL	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G1599A	0	0	1 (<1%)	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0
G1599DEL	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1600T	0	0	1 (<1%)	0	0	0	0	0	0	0

Source: Module 5.3.5.3, ISE Table 2.1053
Note: n = number of participants with the polymorphism listed. Denominator is the number of participants per arm with sequence available across genotypes. Participants may have more than 1 polymorphism.

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

試験別のデータ（表 8）及び併合解析データ（表 9）ともに、ベースラインでベピロビルセン結合部位に多型が認められた被験者では、野生型配列が認められた被験者と比較して Week 24 での HBs 抗原量の低下が少なかったが、低下の程度にはばらつきが認められた。

ベースラインで結合部位の多型が認められ、ベピロビルセン投与後に FC を達成した被験者は 2/14 例（14%）であった（表 10）。FC を達成した被験者で同定されたベースラインの結合部位多型は G1588T（アレル頻度 45.3%）及び C1589A（アレル頻度 14.1%）であった。Week 24 で治療反応が認められた被験者で同定されたベースラインの結合部位多型は C1589A（アレル頻度 41.8%）、C1589A（アレル頻度 98.8%）及び G1599A（アレル頻度 7.85%）であった。

ベースラインの HBs 抗原量≤1000 IU/mL かつ結合部位多型が認められた、ベピロビルセン投与後に FC を達成した被験者は 2/6 例（33%）であった（m5.3.5.4, B-Well 1 VSR, B-Well 2 VSR）。

表 8 Mean change from Baseline in HBsAg (log10 IU/mL) at Week 24 in participants with or without bepirovirsen binding site polymorphisms at Baseline in individual B-Well studies

	B-Well 1		B-Well 2	
Baseline binding site SNP	Placebo (N=327)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=651)	Placebo (N=285)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=571)
Participants without SNP	53	108	42	90
Mean change from Baseline in HBsAg (log10 IU/mL)	-0.0062	-2.9389	-0.0081	-2.9855
Participants with SNP	9	7	5	5
Mean change from Baseline in HBsAg (log10 IU/mL)	0.0326	-2.2102	-0.0709	-2.7759

Source: modified from m5.3.5.4, B-Well 1 and 2 Virology Study Reports Tables 16.

表 9 Summary Table of Change from Baseline HBsAg at Week 24 by participants with or without Baseline binding site polymorphisms in the pooled B-Well analysis

	Pooled studies	
Baseline binding site SNP	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)
Participants who NA cessated		
Participants without SNP	0	31
Mean change from Baseline in HBsAg (log10 IU/mL)	NA	-4.1284
Participants with SNP	0	1
Mean change from Baseline in HBsAg (log10 IU/mL)	NA	-3.9299
Participants who did not NA cessate		
Participants without SNP	96	166
Mean change from Baseline in HBsAg (log10 IU/mL)	-0.0074	-2.7595
Participants with SNP	14	11
Mean change from Baseline in HBsAg (log10 IU/mL)	-0.0043	-2.3110

Source: Module 5.3.5.3, ISE Table 2.1026.

Confidential

表 10 Proportion of participants with or without bepirovirsen binding site polymorphisms at Baseline who achieved Functional Cure at Week 72

	B-Well 1		B-Well 2		Pooled studies	
Baseline binding site SNP	Placebo (N=326)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=652)	Placebo (N=285)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=571)	Placebo (N=611)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=1223)
No	0/60 (0%)	12/114 (11%)	0/47 (0%)	10/97 (10%)	0/107 (0%)	22/211 (10%)
Yes	0/9 (0%)	0/7 (0%)	0/6(0%)	2/7 (29%)	0/15 (0%)	2/14 (14%)

Source: Module 5.3.5.3, ISE Figure 2.1001.

4.3.3.5.B 試験治療下で発現したベピロビルセン結合部位の多型

試験治療下でベピロビルセン結合部位の多型が発現した被験者は、ベピロビルセン群及びプラセボ群ともに少なく、それぞれ 4/73 例（5%）及び 3/92 例（3%）であった（表 11）。

ベースラインの HBs 抗原量≤1000 IU/mL で、試験治療下でベピロビルセン結合部位の多型が発現した被験者は、ベピロビルセン群で 1 例及びプラセボ群で 2 例のみであった。

表 11 Participants with treatment emergent bepirovirsen binding site polymorphisms

	B-Well 1		B-Well 2		Pooled studies	
Number of participants with	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)
Overall population						
Paired Baseline and post-Baseline sequence, N	53	42	39	31	92	73
Total with no treatment emergent polymorphisms, n (%) [a]	52 (98%)	40 (95%)	37 (95%)	29 (94%)	89 (97%)	69 (95%)
Wild type binding site, n (%)	50 (94%)	40 (95%)	35 (90%)	29 (94%)	85 (92%)	69 (95%)
Non treatment emergent polymorphisms, n (%)	2 (4%)	0	2 (5%)	0	4 (4%)	0
Any treatment emergent binding site polymorphism, n (%)	1 (2%)	2 (5%)	2 (5%)	2 (6%)	3 (3%)	4 (5%)
G1581A, n (%)	0	0	1 (3%)	0	1 (1%)	0
A1583G, n (%)	1 (2%)	0	0	0	1 (1%)	0
T1586G, n (%)	0	0	0	1 (3%)	0	1 (1%)
G1588T, n (%)	0	0	1 (3%)	0	1 (1%)	0
C1589A, n (%)	0	1 (2%)	0	0	0	1 (1%)
T1591C, n (%)	0	0	1 (3%)	0	1 (1%)	0
A1593C, n (%)	0	1 (2%)	0	1 (3%)	0	2 (3%)

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

	B-Well 1		B-Well 2		Pooled studies	
Number of participants with	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)	Placebo	Bepirovirsen (300 mg+LD)
Participants with Baseline HBsAg ≤1000 IU/mL						
Paired Baseline and post-Baseline sequences, N	35	22	20	10	-	-
Total with no treatment emergent polymorphisms, n (%) [a]	34 (97%)	21 (95%)	19 (95%)	10 (100%)		
Wild type binding site, n (%)	33 (94%)	21 (95%)	18 (90%)	10 (100%)	-	-
Non treatment emergent polymorphisms, n (%)	1 (3%)	0	1 (5%)	0		
Any treatment-emergent binding site polymorphism, n (%)	1 (3%)	1 (5%)	1 (5%)	0	-	-
A1583G, n (%)	1 (3%)	0	0	0	-	-
G1588T, n (%)	0	0	1 (5%)	0	-	-
C1589A, n (%)	0	1 (5%)	0	0	-	-
T1591C, n (%)	0	0	1 (5%)	0	-	-

Source; Module 5.3.5.3, ISE Table 2.1053, and Module 5.3.5.4, B-Well 1 and 2 Virology Study Reports Tables 12.
Note: Denominator is N, number of HBV sequences. Participants may have more than one polymorphism. "-" data not available.
a. Total with no treatment emergent polymorphisms is the sum of the participants with wild type binding site and non treatment emergent polymorphisms.

各 GT の被験者数及び割合に、多型別の顕著な傾向は認められなかった（表 12）。

Confidential

表 12 Summary of treatment emergent bepirovirsen binding site polymorphisms by HBV Genotype in pooled B-Well 1 and B-Well 2 studies

	HBV Genotype								
Number of participants with	A	B	C	D	E	F	H	I	J
Placebo									
G1581A, n (%)	0	0	1 (1%)	0	0	0	0	0	0
A1583G, n (%)	0	0	0	1 (1%)	0	0	0	0	0
G1588T, n (%)	0	1 (1%)	0	0	0	0	0	0	0
T1591C, n (%)	0	1 (1%)	0	0	0	0	0	0	0
Bepirovirsen (300 mg+LD)									
T1586G, n (%)	1 (1%)	0	0	0	0	0	0	0	0
C1589A, n (%)	0	0	0	0	1 (1%)	0	0	0	0
A1593C, n (%)	0	1 (1%)	1 (1%)	0	0	0	0	0	0

Source: Module 5.3.5.3, ISE Table 2.1053
Note: Denominator is the number of participants per arm with sequence available

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

FC を達成した被験者のうち、試験治療下で結合部位の多型が発現した被験者はいなかった（表 13）。この結果は、試験治療下で結合部位の多型が発現した被験者が少なかった（併合解析データのベピロビルセン群で 4 例）ことに加え、ベースライン後の HBV シーケンシングデータが、HBV DNA/RNA 量が定量可能であった被験者（すなわち、シーケンシングの実施時点で治療反応が低下していることが示唆される被験者）のみから得られたことに起因すると考えられ、予想に反するものではなかった。また、ウイルス抑制のため、得られた HBV シーケンシングデータの総数が全体的に少なかったことが影響した可能性もある。

表 13 Proportion of participants with or without treatment emergent bepirovirsen binding site polymorphisms who achieved Functional cure at Week 72

	B-Well 1		B-Well 2		Pooled studies	
Treatment emergent binding site SNP	Placebo (N=326)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=652)	Placebo (N=285)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=571)	Placebo (N=611)	Bepirovirsen (300 mg+LD) (N=1223)
No	0 (0%)	127 (19%)	0 (0%)	106 (19%)	0 (0%)	233 (19%)
Yes	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Source: Module 5.3.5.3, ISE Table 2.1058
Note: Denominator is the number of participants per arm.

4.3.3.6.B ベピロビルセン結合部位以外で同定されたアミノ酸置換

ベピロビルセン及びプラセボを投与され、ベースラインで HBV シーケンシングデータが得られたすべての被験者で、HBV ゲノムの参照配列（X02763）との比較からベピロビルセン結合部位以外でアミノ酸の差異が認められた（m5.3.5.4, B-Well 1 VSR, B-Well 2 VSR）。ベースラインにいずれかの治療群の 10 例超で認められたため、共通して認められると判断されたアミノ酸置換は、B-Well 1 試験で 42 種類、B-Well 2 試験で 28 種類であった。試験治療下でいずれかの治療群の 5 例超に共通して認められたアミノ酸置換は、B-Well 1 試験で 5 種類、B-Well 2 試験で 2 種類であった。ベースラインに結合部位以外で多く認められたこれらのアミノ酸置換は、いずれの治療群でも認められ、Week 24 及び 48 のベピロビルセンへの治療反応並びに Week 72 の FC に影響を及ぼさなかった。

4.3.3.7.B 表現型解析の結果

併合解析の結果、ベースラインで認められたベピロビルセン結合部位の多型は 20 種類であり（表 6）、ベピロビルセン投与後に発現した多型は 7 種類であった（表 11）。このうち、ベピロビルセン群でベースラインに認められた多型は 13 種類（表 6）、ベピロビルセン投与後に発現した多型は 3 種類であった（表 11）。20 種類の多型のうち、B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験でベースライン又はベピロビルセン投与後に発現した 20 種類の多型のうち、7 種類（G1581A、G1588A、C1589A、T1590C、A1593C、A1593G、C1600T）については、過去に *in vitro* でのウイルスの適応度が検証されており、野生型と比較した時の HBs 抗原の分泌量は 3.4%～108.6%であることが示されている（図 10）。また、3 種類（G1588A、

Confidential

C1589A、C1600T）については、過去に *in vitro* でのベピロビルセンに対する感受性が検証されており、野生型と比較した時の EC50 の変化倍率は 1.2～4.1 であることが示されている（表 2）。

4.3.3.8.B HBcr 抗原及び HBV RNA

B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験ともに、ベピロビルセンを投与された被験者での Week 12、24 及び 48 の HBcr 抗原量の平均値は、ベースラインと比較して低かった（m5.3.5.4, B-Well 1 VSR, B-Well 2 VSR）。いずれの試験でも、ベピロビルセン群で Week 12、24 及び 48 に HBcr 抗原が検出されなかった被験者の割合は、FC を達成しなかった被験者と比較して達成した被験者で数値的に高かった（表 14）。

B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験ともに、多くの被験者（各試験及び治療群の 72%超）でベースラインに HBV RNA は検出されなかった（m5.3.5.4, B-Well 1 VSR, B-Well 2 VSR）。いずれの試験でも、ベピロビルセン群で Week 12、24 及び 48 に HBV RNA が検出されなかった被験者の割合は、FC を達成しなかった被験者と比較して達成した被験者で数値的に高かった（表 14）。

Confidential

表 14 Summary of HBcrAg and HBV RNA not detected at Week 12, 24 and 48 by FC

	B-Well 1				B-Well 2			
	Placebo		Bepirovirsen (300 mg+LD)		Placebo		Bepirovirsen (300 mg+LD)	
	FC = Yes	FC = No	FC = Yes	FC = No	FC = Yes	FC = No	FC = Yes	FC = No
HBcrAg not detected								
Week 12	0	102/314 (32%)	65/123 (53%)	176/488 (36%)	0	68/261 (26%)	39/104 (38%)	142/431 (33%)
Week 24	0	86/300 (29%)	68/126 (54%)	161/485 (33%)	0	70/254 (28%)	40/105 (38%)	147/433 (34%)
Week 48	0	88/288 (31%)	65/127 (51%)	144/479 (30%)	0	58/250 (23%)	42/104 (40%)	129/429 (30%)
HBV RNA not detected								
Week 12	0	229/312 (73%)	126/126 (100%)	444/493 (90%)	0	201/268 (75%)	106/106 (100%)	394/437 (90%)
Week 24	0	236/303 (78%)	126/126 (100%)	460/490 (94%)	0	201/258 (78%)	106/106 (100%)	400/434 (92%)
Week 48	0	223/287 (78%)	127/127 (100%)	415/483 (86%)	0	197/250 (79%)	103/103 (100%)	376/430 (87%)

Source: modified from m5.3.5.4, B-Well 1 and 2 Virology Study Reports Tables 22 and 24. Note: Denominator is the number of participants with available lab data at each timepoint and who achieved or did not achieve FC at Week 72 in each study

Confidential

4.3.3.9.B　サブセットを対象とした Architect HBsAg Next アッセイでの探索的評価

主要評価項目の解析に用いた定性的 Elecsys® HBsAg II アッセイ（LLOD<0.05 IU/mL）で HBs 抗原が検出されなかった RoW の被験者の検体をサブセットに選択し、定性的 Architect HBsAg Next アッセイ（LLOD<0.005 IU/mL）で Week 24 及び 48 の HBs 抗原の検出の有無を測定した。本解析の目的は、より高感度な別の HBs 抗原アッセイが、治療反応を早期に探索的に予測するために有用であるかを評価することであった。

Elecsys® HBsAg II アッセイで HBs 抗原が検出されなかった多くの被験者で、Architect HBsAg Next アッセイでも HBs 抗原は検出されなかった。B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験ともに、Elecsys® HBsAg II アッセイ及び Architect HBsAg Next アッセイの両方で HBs 抗原が検出されなかった被験者の割合は、FC を達成しなかった被験者と比較して達成した被験者で数値的に高かった（表 15）。

Confidential

表 15 Summary of Abbott Architect Next Assay result of HBsAg not detected at Weeks 24, and 48 by FC in a subset of participants

Abbott Architect Next Assay result of HBsAg not detected	B-Well 1				B-Well 2			
	Placebo N=328		Bepirovirsen (300 mg+LD) N=650		Placebo N=286		Bepirovirsen (300 mg+LD) N=570	
Achieved FC (determined by the Elecsys® HBsAg II assay)	FC = Yes	FC = No	FC = Yes	FC = No	FC = Yes	FC = No	FC = Yes	FC = No
Week 24	0	0	85/90 (94%)	63/110 (57%)	0	0	64/64 (100%)	52/76 (68%)
Week 48	0	0	90/93 (97%)	18/27 (67%)	0	0/1	64/67 (96%)	9/18 (50%)

Source; modified from Module 5.3.5.4 B-well 1 and 2 Virology Study reports Tables 25. N = total number of participants in each arm. Only subjects with Abbott Architect HBsAg Next data at the relevant visit are included in this table. Denominators represent the number of participants at each timepoint that achieved or did not achieve FC at Week 72, of which the percentages represent the proportion of participants that had an HBsAg result of not detected by the Abbott Architect HBsAg Next assay.

Confidential

4.3.3.10.B　結論

- B-Well 1 試験又は B-Well 2 試験の被験者から、既知の全 10 種類の GT（A、B、C、D、E、F、G、H、I 及び J）が検出された。最も多くの被験者で検出された GT は C であった。
- B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験の併合解析から、ベースラインでベピロビルセン結合部位に多型が認められた被験者は 29/347 例（8%）であった。各試験での当該被験者の割合は同程度であり、ベピロビルセンを投与された被験者では B-Well 1 試験で 7/123 例（6%）、B-Well 2 試験で 7/104 例（7%）に認められた。
- B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験の併合解析から、ベースラインで最も多く認められた結合部位の多型は C1589A であり、各試験のそれぞれ 3 例及び 2 例に認められた。
- B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験の併合解析から、ベースラインでベピロビルセン結合部位に多型が認められた被験者では、野生型配列が認められた被験者と比較して HBs 抗原量の低下が少なかったが、低下の程度にはばらつきが認められた。ベースラインでベピロビルセン結合部位の多型が認められた 14 例のうち、FC を達成した被験者は 2 例（14%）であった。
- B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験の併合解析から、試験治療下でベピロビルセン結合部位の多型が発現した被験者はわずかであり、ベピロビルセン群で 4/73 例（5%）、プラセボ群で 3/92 例（3%）であった。各試験での当該被験者の割合は同程度であり、ベピロビルセンを投与された被験者では B-Well 1 試験で 2/42 例（5%）、B-Well 2 試験で 2/31 例（6%）に認められた。
- 各 GT の被験者数及び割合に、ベースライン及び試験治療下の多型別の顕著な傾向は認められなかった。
- 全被験者集団及びベースラインの HBs 抗原量≤1000 IU/mL の被験者集団ともに、ベースライン及び試験治療下で発現したベピロビルセン結合部位の多型並びに関連する治療反応が認められた被験者は少なかった。
- B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験で検出された 7 種類の多型は、*in vitro* で表現型が評価されており、ウイルスの適応度が低いか、ベピロビルセンに対する感受性が 1.2～4.1 倍変化することが示されている。

4.3.4.B　B-Sure 試験

B-Sure 試験は、先行試験でベピロビルセンを投与された complete responder 又は partial responder を対象に、FC の持続性（治療反応消失までの時間で測定）を評価する、第 2b 相、国際多施設共同、長期追跡調査試験であった。

本試験では、ベピロビルセンを用いた親試験で治験薬を 1 回以上投与され、親試験終了時に完全奏効又は部分奏効を達成した被験者を組み入れた。本試験では被験者にベピロビルセンを投与しなかった。本試験の主要目的は、過去のベピロビルセンの治療レジメンにより FC が持続することを長期追跡調査で確認することであった。

B-Clear 試験、B-Together 試験及び B-Fine 試験の被験者を、本試験のウイルス学的中間解析の対象とした。本試験に組み入れられた被験者のうち、親試験の試験期間中及び試験終了

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

時来院に安定した NA 治療を受けていた被験者集団を On-NA 集団と定義し、親試験の試験期間中に NA 治療を受けていなかった被験者集団を Not-On-NA 集団と定義した。肝硬変所見の病歴又は合併がなく、組入れ時に安定した NA 治療を受けている被験者が、治験実施計画書で規定した NA 治療中止基準に合致した場合、本試験の開始から 3 ヵ月後に NA 治療を中止することとした。本項では、B-Clear 試験、B-Fine 試験及び B-Together 試験の被験者を対象としたウイルス学的中間解析（データカットオフ日：2025 年 9 月 23 日）の結果を要約する（m5.3.5.4, B-Sure VSR）。

4.3.4.1.B　結果

4.3.4.1.1.B　遺伝子型解析の結果

親試験全体で、HBs 抗原又は HBV DNA 耐性モニタリング基準に該当し、本試験でのシーケンシングの解析対象となった被験者の割合は、On-NA 集団で 56%（38/68 例）、Not-on-NA 集団で 53%（9/17 例）であった。本試験でシーケンシングデータが得られた被験者の割合は、On-NA 集団で 26%（18/68 例）、Not-On-NA 集団で 24%（4/17 例）であった。このうち親試験のベースラインでのシーケンシングと対応するデータが得られた被験者の割合は On-NA 集団で 12%（8/68 例）、Not-On-NA 集団で 24%（4/17 例）であり、これらの被験者を対象に、親試験でのベピロビルセン投与後に本試験の追跡調査で認められた多型の発現を評価することが可能であった。

本試験に組み入れた被験者のうち、親試験で規定されたシーケンシング解析、血清学的検査及び治験責任（分担）医師の報告に基づき GT が判定された被験者の割合は、On-NA 集団で 99%（67/68 例）、Not-on-NA 集団で 100%（17/17 例）であった。本試験に組み入れた被験者で認められた GT は 6 種類（A、B、C、D、E 及び I）であった。親試験及び本試験の両方で GT が判定された被験者の多く［On-NA 集団 67%（12/18 例）、Not-on-NA 集団 100%（4/4 例）］で GT の一致が認められ、On-NA 集団の一部の被験者で親試験と本試験で GT の不一致が認められた。

親試験のベースライン及び本試験でのシーケンシング解析の結果、本試験のほぼすべての被験者でベピロビルセン結合部位に野生型配列が認められ、その割合は親試験のベースラインでは On-NA 集団の 96%（22/23 例）及び Not-on-NA 集団の 100%（17/17 例）であり、本試験では On-NA 集団の 89%（16/18 例）及び Not-on-NA 集団の 100%（4/4 例）であった。親試験で On-NA であった被験者のうち、本試験でベピロビルセン結合部位に多型が認められた被験者の割合は 11%（2/18 例）であった。また、親試験のベースラインと本試験で対応するシーケンシングデータが得られ、On-NA であった被験者（8 例）のうち、本試験で新たに結合部位の多型が認められた被験者は 1 例（13%）であった。B-Clear 試験で Not-On-NA であった被験者については、本試験のいずれの来院時点でもベピロビルセン結合部位の多型は認められず、本試験で新たに認められた結合部位の多型もなかった。親試験の試験治療下でベピロビルセン結合部位の多型が新たに認められた被験者はいなかった。

親試験で On-NA であった被験者に、ベピロビルセン結合部位の多型として A1583G 及び G1588A が認められ、このうち G1588A は本試験で発現した。親試験のベースラインで 1 例から C1582T の多型が検出されたが、同じ被験者から得られた本試験のシーケンシングデー

Confidential

タでは、この多型は検出されなかった。本試験で結合部位の多型が検出された被験者は、親試験で partial responder 又は non responder であった。

親試験のベースラインでは検出されなかった新たなベピロビルセン結合部位以外のアミノ酸多型が、本試験の On-NA 集団の 2 例以上で 5 種類認められた。また、B-Clear 試験の Not-On-NA 集団では、本試験で 2 例以上に新たなベピロビルセン結合部位以外のアミノ酸置換が 10 種類認められた。主なアミノ酸置換は X 蛋白質の G135V であり、Not-On-NA 集団の 75%（3/4 例）から検出された。

4.3.4.1.2.B 探索的なウイルス学的バイオマーカー（HBV RNA 及び HBcr 抗原）解析の結果

本試験のベースラインでの HBcr 抗原量の平均値は低く、ベースラインからの平均変化は小さかった。HBV RNA は本試験のベースラインで検出されず、HBV RNA 量の平均値はベースラインからわずかに上昇した。RoW のアッセイでは、多くの被験者で HBV RNA 量 <LLOD であり、変化が少数の被験者の結果により影響されている可能性があるため、データの解釈は困難である。

4.3.4.2.B B-Sure 試験の臨床ウイルス学的解析の結論

本試験でシーケンシングデータが得られた被験者の割合は、On-NA 集団で 26%（18/68 例）、Not-On-NA 集団で 24%（4/17 例）であった。多くの GT は親試験で判定された GT と一致した。本試験の On-NA 集団で結合部位の多型が認められた被験者の割合は 11%（2/18 例）であり、本試験で結合部位の多型が新たに認められた被験者の割合は 13%（1/8 例）であった。親試験で Not-On-NA であった被験者については、本試験で結合部位の多型は認められなかった。

4.3.5.B B-Clear 試験

B-Clear 試験は、HBV 持続感染患者にベピロビルセンを投与した時の有効性及び安全性を評価する、第 2b 相、多施設共同、ランダム化、部分盲検、並行群間試験であった。

本試験では、NA 治療を受けている又は受けていない HBV 持続感染患者を組み入れた。被験者を、第 1 治療群（ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間投与）、第 2 治療群（ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 12 週間投与した後、150 mg を週 1 回 12 週間投与）、第 3 治療群（ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 12 週間投与した後、プラセボを週 1 回 12 週間投与）、及び第 4 治療群（プラセボを週 1 回 12 週間投与した後、ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 12 週間投与）のいずれかにランダム化した。有効性主要評価項目を、レスキュー薬なしで、ベピロビルセン投与終了後 24 週間にわたり HBs 抗原量<LLOQ 及び HBV DNA 量 <LLOQ を達成すること（SVR）と規定した。本試験に組み入れた被験者は、NA 治療を受けている被験者（On-NA コホート）が計 227 例（うち臨床ウイルス学的解析対象は 226 例）、NA 治療を受けていない被験者（Not-on-NA コホート）が計 230 例（うち臨床ウイルス学的解析対象は 229 例）であった。本試験の臨床ウイルス学的解析報告書（m5.3.5.4, B-Clear VSR Amendment）の要約を本項に示す。

Confidential

4.3.5.1.B　結果

4.3.5.1.1.B　遺伝子型解析の結果

本試験では SVR を達成した被験者の割合が低かった。そのため、HBV 耐性モニタリング基準の HBs 抗原量の規定に該当した被験者が多く、On-NA コホートでは 207 例（92%）、Not-on-NA コホートでは 211 例（92%）が該当した。On-NA コホートのうち、ベースライン及びベースライン後の HBV のシーケンシングデータが得られた被験者はそれぞれ 90 例（40%）及び 49 例（22%）であった。Not-on-NA コホートのうち、ベースライン及びベースライン後の HBV のシーケンシングデータが得られた被験者はそれぞれ 219 例（96%）及び 143 例（62%）であった。

本試験に組み入れた被験者から特定された HBV GT は 7 種類（A、B、C、D、E、F 及び H）であった。すべての検査方法を通じて、On-NA コホートで最も多く検出された GT は C（93 例、41%）であり、次いで D（61 例、27%）であった。Not-on-NA コホートで最も多く検出された GT は C（70 例、31%）であり、次いで B（49 例、21%）、D（45 例、20%）及び A（41 例、18%）が、それぞれ同程度の被験者数及び割合で認められた。5 例以上で認められた GT のうち、A では、On-NA 及び Not-on-NA コホートともに、ベースラインの HBs 抗原量の平均値が最も高く、ベースラインからの HBs 抗原の最大低下量の平均値（対数変換値）が最も低かった。一方で、B では、On-NA 及び Not-on-NA コホートともに、ベースラインの HBs 抗原量の平均値が最も低く、ベースラインからの HBs 抗原の最大低下量の平均値（対数変換値）が最も高かった。GT A、B、C、D 及び E で、HBs 抗原が陰性化した被験者が認められた。

ベースラインでベピロビルセン結合部位の多型が検出された被験者の割合は、On-NA コホートで 10%（9/90 例）、Not-on-NA コホートで 6%（13/219 例）であった（表 16）。ベースラインで多型が多く検出された配列位置は 1589 及び 1590 であり、それぞれ 5 例及び 6 例に認められた。ベースラインでベピロビルセン結合部位の多型が検出された被験者に最も多く検出された多型は C1589A［5/22 例（22.7%）］であり、次いで T1590G［3/22 例（13.6%）］であった。ベースラインのベピロビルセン結合部位の多型の多くは、アレル頻度が>15%であった（表 17）。ベースラインでのベピロビルセン結合部位の多型（アレル頻度を問わない）はウイルス学的効果の違いを問わず認められ、HBs 抗原の陰性化達成後に再発した被験者では 4 例、partial responder では 10 例、non responder では 8 例に認められた。ベースラインでベピロビルセン結合部位の多型が検出された被験者では、多型が検出されなかった被験者と比較して、HBs 抗原の低下量が少なかった。しかし、ベースラインでのベピロビルセン結合部位の多型がウイルス学的効果に及ぼす影響についての解釈は依然として不明確であり、本試験でのベースラインの HBs 抗原量、多型の位置及びアレル頻度のばらつき、並びに用法・用量の違い等の要因のため、解釈は複雑である。

Confidential

表 16 Summary of Baseline Bepirovirsen Binding Site Polymorphisms

Number of participants with polymorphism at:	Arm 1[a]	Arm 2[a]	Arm 3[a]	Arm 4[a]	Total
On-NA					
	(N=68)	(N=67)	(N=68)	(N=23)	(N=226)
Baseline Sequence Available	30 (44%)	25 (37%)	27 (40%)	8 (35%)	90 (40%)
C1582T	1 (3%)	0	0	0	1 (1%)
A1583G	0	1 (4%)	0	0	1 (1%)
T1585C	0	0	1 (4%)	0	1 (1%)
T1586C	0	1 (4%)	0	0	1 (1%)
G1588A	1 (3%)	0	0	0	1 (1%)
C1589A	0	1 (4%)	0	0	1 (1%)
A1593G	1 (3%)	0	0	1 (13%)	2 (2%)
T1598C	0	0	1 (4%)	0	1 (1%)
Total per arm at Baseline	3 (10%)	3 (12%)	2 (7%)	1 (13%)	9 (10%)
Not-On-NA					
	(N=70)	(N=67)	(N=68)	(N=24)	(N=229)
Baseline Sequence Available	68 (97%)	65 (97%)	62 (91%)	24 (100%)	219 (96%)
G1581A	0	0	0	1 (4%)	1 (<1%)
C1582T	1 (1%)	0	0	0	1 (<1%)
C1589A	1 (1%)	2 (3%)	1 (2%)	0	4 (2%)
T1590A	0	1 (2%)	0	1 (4%)	2 (<1%)
T1590C	0	1 (2%)	0	0	1 (<1%)
T1590G	0	1 (2%)	1 (2%)	1 (4%)	3 (1%)
C1600T	0	1 (2%)	1 (2%)	0	2(<1%)
Total per arm at Baseline	2 (3%)	5 (8%)[b]	3 (5%)	3 (13%)	13 (6%)

Source: modified from m5.3.5.4, B-Clear VSR Amendment Table 13 and Table 14
a. Arm 1 = (300 mg+LD)X24W; Arm 2 = (300 mg+LD)X12W+150 mgX12W;
Arm 3 = (300 mg+LD)X12W+PlaceboX12W; Arm 4 = PlaceboX12W+300 mgX12W.
b. One participant had 2 nucleotide polymorphisms (T1590A, T1590C) and is counted only once.

Confidential

表 17 Summary of Baseline Bepirovirsen Binding Site Polymorphisms and Virological Response

Treatment Arm[a]	Participant ID	Visit	Geno type	Binding Site Polymorphism	Allelic Frequency (%) *	Achieved sustained HBsAg suppression	Achieved HBsAg <LLOQ at any timepoint	Baseline HBsAg (log10 IU/mL)	Max HBsAg reduction (log10 IU/mL)	Virological Response[b]
On-NA										
Arm 1	[redacted]	WK 1 DAY 1	C	C1582T	5.58	No	Yes	2.83	-4.23	relapse
Arm 1		WK 1 DAY 1	B	A1593G	36.2	No	No	3.01	-0.33	non-responder
Arm 1		WK 1 DAY 1	C	G1588A	8.23	No	No	3.39	-2.77	partial responder
Arm 2		WK 1 DAY 1	C	A1583G	29.7	No	No	3.32	-0.26	non-responder
Arm 2		WK 1 DAY 1	C	C1589A	99.9	No	Yes	2.64	-4.04	relapse
Arm 2		WK 1 DAY 1	A	T1586C	14.1	No	No	4.37	-0.38	non-responder
Arm 3		WK 1 DAY 1	D	T1598C	11.2	No	No	3.36	-2.45	partial responder
Arm 3		WK 1 DAY 1	C	T1585C	8.66	No	No	3.72	-0.55	non-responder
Arm 4		WK 1 DAY 1	C	A1593G	9.2	No	No	3.70	-2.91	partial responder
Not-on-NA										
Arm 1	[redacted]	WK 1 DAY 1	A	C1582T	9.57	No	No	4.24	-4.12	partial responder
Arm 1		WK 1 DAY 1	A	C1589A	25.6	No	No	4.30	-2.64	partial responder
Arm 2		WK 1 DAY 1	C	C1600T	71.8	No	No	3.54	-2.14	partial responder
Arm 2		WK 1 DAY 1	A	C1589A	85.2	No	No	3.93	-0.33	non-responder

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

Treatment Arm[a]	Participant ID	Visit	Geno type	Binding Site Polymorphism	Allelic Frequency (%) *	Achieved sustained HBsAg suppression	Achieved HBsAg <LLOQ at any timepoint	Baseline HBsAg (log10 IU/mL)	Max HBsAg reduction (log10 IU/mL)	Virological Response[b]
Arm 2	[redacted]	WK 1 DAY 1	D	T1590G	5.68	No	No	3.62	-1.79	partial responder
Arm 2		WK 1 DAY 1	C	T1590A	35.2	No	No	3.05	-2.76	partial responder
				T1590C	16.6					
Arm 2		WK 1 DAY 1	B	C1589A	85.4	No	Yes	2.56	-3.96	relapse
Arm 3		WK 1 DAY 1	A	C1589A	89	No	No	3.54	-0.13	non-responder
Arm 3		WK 1 DAY 1	E	C1600T	44.6	No	No	4.03	-1.75	partial responder
Arm 3		WK 1 DAY 1	D	T1590G	39.3	No	No	3.68	-0.51	non-responder
Arm 4		WK 1 DAY 1	D	T1590A	15.6	No	No	4.60	-0.36	non-responder
Arm 4		WK 1 DAY 1	D	G1581A	23	No	Yes	2.71	-4.11	relapse
Arm 4		WK 1 DAY 1	C	T1590G	7.86	No	No	3.07	-3.41	partial responder

*Allelic frequency ≥5%

Source: m5.3.5.4, B-Clear VSR Amendment Table 15

a. Arm 1 = (300 mg+LD)X24W; Arm 2 = (300 mg+LD)X12W+150 mgX12W; Arm 3 = (300 mg+LD)X12W+PlaceboX12W; Arm 4 = PlaceboX12W+300 mgX12W.

b. Virological response for B-Clear was defined as follows: non-responder is a participant that achieved <1 $\log_{10}$ IU/mL maximum HBsAg reduction; partial responder is a participant that achieved a ≥1 $\log_{10}$ IU/mL maximum HBsAg reduction, but did not reach LLOQ; relapse is a participant that achieved HBsAg LLOQ at any timepoint, but did not sustain HBsAg suppression; SVR is defined as HBsAg <LLOQ and HBV DNA <LLOQ for 24 weeks from the end of planned bepirovirsen treatment.

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

ベースライン後、ベピロビルセン投与と関連のない結合部位の多型が 8 例に認められた。このうち partial responder は 5 例、non responder は 3 例であった。ベースライン及びベースライン後にアレル頻度が>15%の多型が検出された被験者は 6 例であった。

治療期間後に、ベピロビルセン投与後に結合部位の多型が発現した被験者は 8 例であり、On-NA コホートで 3/49 例（6%）、Not-on-NA コホートで 5/143 例（3%）であった。アレル頻度別の内訳は、アレル頻度が<15%の多型が 6 例、アレル頻度が 27.5%及び 33%の多型が各 1 例であった（表 18）。ベピロビルセン投与後に結合部位の多型が最も多く検出された配列位置は C1589（C1589A 3 例、C1589T 1 例）であった。

一次及び二次 NA 耐性多型[Zhang, 2019]が検出された被験者は 8 例であった。一次 NA 耐性多型が検出された被験者は 1 例を除いていずれも NA 治療を受けており、このうち 1 例の耐性置換はベピロビルセン投与後に発現がみられた。いずれの被験者も、HBs 抗原の持続的な抑制を達成しなかった。

ベピロビルセン結合部位以外では、ベースラインの個々のアミノ酸多型とウイルス学的効果に、明確な関係は認められなかった。結合部位以外では、On-NA コホートのいずれかの治療群の 2 例以上で、ベピロビルセン投与後に P/RT、S 及び X 蛋白質領域のアミノ酸多型が 12 件発現した。また、Not-on-NA コホートのいずれかの治療群の 5 例以上で、ベピロビルセン投与後にコア、プレコア、P/RT、S 及び X 蛋白質領域のアミノ酸多型が 14 件発現した。HBV ゲノムのオープンリーディングフレームが重複しているため、RT 及び S 蛋白質領域でベピロビルセン投与後に発現したアミノ酸多型は、P/RT 及び S 蛋白質のコード領域でベピロビルセン投与後に発現した一塩基多型に起因していた。

Confidential

表 18 Summary of Treatment-Emergent Bepirovirsen Binding Site Polymorphisms and Virological Response

Treatment Arm[a]	Participant ID	Visit	Genotype	Binding Site Polymorphism	Allelic Frequency (%) *	Achieved sustained HBsAg suppression	Achieved HBsAg <LLOQ at any timepoint	Baseline HBsAg (log_{10} IU/mL)	Max HBsAg reduction (log_{10} IU/mL)	Virological Response[b]
On-NA										
Arm 1	[redacted]	WK 24 DAY 162	A	G1581A	6.08	No	No	3.24	-0.23	non-responder
Arm 2	[redacted]	OT-W20 OT-DAY 134	E	C1589T	33	No	No	3.60	-2.25	partial responder
Arm 2	[redacted]	OT-W20 OT-DAY 134	C	G1588A	9.18	No	No	3.09	-3.7	partial responder
Not-on-NA										
Arm 1	[redacted]	WK 24 DAY 162	A	C1589A	11.4	No	No	4.21	-0.35	non-responder
Arm 1	[redacted]	OT-W12 OT-DAY 78	B	C1595T	27.5	No	No	3.76	-3.35	partial responder
Arm 3	[redacted]	WK 24 DAY 162	A	C1589A	5.63	No	No	2.31	-0.31	non-responder
Arm 4	[redacted]	OT-W8 OT-DAY 50	A	C1589A	7.73	No	No	3.95	-1.97	partial responder
Arm 4	[redacted]	WK 24 DAY 162	E	T1590C	14.2	No	No	4.04	-0.25	non-responder

*Allelic frequency ≥5%
Source: m5.3.5.4, B-Clear VSR Amendment Table 17
a. Arm 1 = (300 mg+LD)X24W; Arm 2 = (300 mg+LD)X12W+150 mgX12W; Arm 3 = (300 mg+LD)X12W+PlaceboX12W; Arm 4 = PlaceboX12W+300 mgX12W.
b. Virological response for B-Clear was defined as follows: non-responder is a participant that achieved <1 log_{10} IU/mL maximum HBsAg reduction; partial responder is a participant that achieved a ≥1 log_{10} IU/mL maximum HBsAg reduction, but did not reach LLOQ; relapse is a participant that achieved HBsAg LLOQ at any timepoint, but did not sustain HBsAg suppression; SVR is defined as HBsAg <LLOQ and HBV DNA <LLOQ for 24 weeks from the end of planned bepirovirsen treatment.

Confidential

4.3.5.1.2.B 探索的なウイルス学的バイオマーカー（HBV RNA 及び HBcr 抗原）解析の結果

ベースラインの HBcr 抗原量及び HBV RNA 量は、On-NA 又は Not-on-NA コホートのウイルス学的効果の予測因子ではなかった。試験期間中、HBcr 抗原量及び HBV RNA 量はベピロビルセンの曝露量に応じて低下した。投与終了時の HBV RNA 量からはウイルス学的効果を予測できないと考えられた。Not-on-NA コホートについてのみ、投与終了時の HBcr 抗原量からウイルス学的効果が予測できると考えられたが、予測の評価のためには更なるデータが必要である。

4.3.5.2.B B-Clear 試験の臨床ウイルス学的解析の結論

- 本試験に組み入れられた被験者から特定された HBV GT は 7 種類（A、B、C、D、E、F 及び H）であった。On-NA 及び Not-on-NA コホートの両方で多く認められた GT は C であった。
- すべての主な GT で、HBs 抗原の消失が認められた。
- ベースラインでベピロビルセン結合部位の多型が検出された被験者の割合は、On-NA コホートで 10%（9/90 例）、Not-on-NA コホートで 6%（13/219 例）であった。
- ベースラインで多型が多く検出された配列位置は 1589 及び 1590 であり、それぞれ 5 例及び 6 例で認められた。
- ベースラインでベピロビルセン結合部位の多型が検出された被験者では、多型が検出されなかった被験者と比較して、HBs 抗原の低下量が少なかった。しかし、本試験での用法・用量の違い等の要因がウイルス学的効果に及ぼす影響については、依然として不明確である。
- 治療期間後にベピロビルセン投与後に結合部位の多型が発現した被験者は 8 例であり、On-NA コホートで 3/49 例（6%）、Not-on-NA コホートで 5/143 例（3%）であった。
- ベピロビルセン投与後に結合部位の多型が最も多く発現した配列位置は C1589（C1589A 3 例、C1589T 1 例）であった。

4.3.6.B B-Clear 試験での iTACT HBs 抗原及び iTACT HBcr 抗原解析

本解析は、B-Clear 試験の被験者サブセットから得られた血清検体を対象に、iTACT HBs 抗原アッセイ及び iTACT HBcr 抗原アッセイを用いて実施した後向き事後解析であった。これらのアッセイは B-Clear 試験の主要解析で用いた従来法と比較して、より高感度であった。本事後解析での臨床ウイルス学的解析（m5.3.5.4, B-Clear iTACT Assay VSR）の要約を本項に示す。

4.3.6.1.B 検体及び方法

4.3.6.1.1.B 解析対象集団

本解析には、B-Clear 試験のいずれかの治療群に含まれ、HBe 抗原陰性又はセロコンバージョンが認められ、かつ Roche Elecsys HBsAg II Quant II（Elecsys HBs 抗原アッセイ）で

Confidential

HBs 抗原量が LLOD 未満の検体を試験期間中に 1 回以上得られた被験者サブセットを含めた（中国で組み入れられた被験者を除く）。解析対象は 50 例であり、治療期間の Week 9、17 及び 23 並びに後観察期間の Week 4、12 及び 24 の 6 評価時点での検体（合計 299 検体）を評価した。

4.3.6.1.2.B　iTACT HBs 抗原解析

本解析では、開発中の Fujirebio iTACT HBsAg（iTACT HBs 抗原アッセイ）を用いて血清 HBs 抗原量を評価した。iTACT HBs 抗原アッセイの手順には、前処理として抗原抗体免疫複合体を解離させるための酸性処理工程が含まれる。iTACT HBs 抗原アッセイで得られた HBs 抗原量データを、B-Clear 試験の主要解析で用いた Elecsys HBs 抗原アッセイで得られたデータと比較した。

4.3.6.1.3.B　iTACT HBcr 抗原解析

本解析では、Fujirebio Lumipulse Presto iTACT HBcrAg（iTACT HBcr 抗原アッセイ）を用いて血清 HBcr 抗原量を評価した。iTACT HBcr 抗原アッセイの手順には、前処理として抗原抗体免疫複合体を解離させるための酸性処理工程が含まれる。iTACT HBcr 抗原アッセイで得られた HBcr 抗原量データを、B-Clear 試験の主要解析で用いた Fujirebio Lumipulse G HBcrAg（Lumipulse HBcr 抗原アッセイ）で得られたデータと比較した。

4.3.6.2.B　結果

iTACT HBs 抗原アッセイ、iTACT HBcr 抗原アッセイ及び B-Clear 試験の主要解析で用いた従来法から得られたデータを統合解析した。

4.3.6.2.1.B　HBs 抗原アッセイの比較

iTACT HBs 抗原アッセイ及び Elecsys HBs 抗原アッセイのペアデータは 294 検体から得られ、これらを統合解析に用いた。iTACT HBs 抗原アッセイでは、Elecsys HBs 抗原アッセイで HBs 抗原量が LLOD 未満であった検体のうちの 90.2%の検体の定量に成功した。両アッセイの定量範囲内では、若干のバイアス（切片=0.26、傾き=0.83）を伴う線形の相関関係（Pearson r=0.856）が認められた。両アッセイの結果から、主要な治療反応との縦断的関連性が統計学的に有意であることが示された（いずれのアッセイも p=0.0011）。治療期間の Week 17 及び 23 並びに後観察期間の Week 4 で、iTACT HBs 抗原アッセイの結果と主要な治療反応に明らかな関連性が認められた。iTACT HBs 抗原アッセイにより、B-Clear 試験での主要な治療反応及び再発の予測精度は数値的に向上した。

4.3.6.2.2.B　HBcr 抗原アッセイの比較

iTACT HBcr 抗原アッセイ及び Lumipulse HBcr 抗原アッセイのペアデータは 46 検体から得られ、これらを統合解析に用いた。両アッセイの定量範囲内では、若干のバイアス（切片=－0.86、傾き=1.16）を伴うものの高い一致度（Pearson r=0.976）が認められた。いずれの

Confidential

HBcr 抗原アッセイの結果にも、B-Clear 試験の主要な治療反応との統計学的関連性は認められなかった。

4.3.6.3.B 結論

iTACT HBs 抗原アッセイ及び iTACT HBcr 抗原アッセイで感度が向上した理由の一部として、前処理工程により分析対象物である抗原及び抗原に対する抗体からなる免疫複合体が解離したことで、より多くの遊離抗原が定量可能となったことが考えられる。これらのデータから、HBs 抗原の高感度測定の有用性が示されたものの、データを現解析よりも広範な解析に外挿するためには、より大規模な集団及び更なる評価時点での評価が必要である。

4.3.7.B B-Together 試験

B-Together 試験は、安定した NA 治療を受けている HBV 持続感染患者にベピロビルセンを投与し、その後 PegIFN を投与する sequential 療法を実施した時の有効性及び安全性を評価する、第 2b 相、多施設共同、ランダム化、非盲検試験であった。有効性主要評価項目を、レスキュー薬なしで、sequential 療法終了後 24 週間にわたり HBs 抗原量<LLOQ 及び HBV DNA 量<LLOQ を達成することと規定した。

被験者を、ベピロビルセン 300 mg を週 1 回 24 週間又は 12 週間投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）する、いずれかの治療群に 1：1 の比でランダム化した。ベピロビルセンの投与終了後、PegIFN 180 μg を週 1 回、最大 24 週間投与した。PegIFN の投与終了後、被験者を更に 24 週間又は 36 週間追跡した（治療期間終了後の後観察期間）。試験期間中、被験者は NA 治療を継続した。本試験に組み入れた被験者は計 108 例であり、第 1 治療群（ベピロビルセン 300 mg を 24 週間投与し、PegIFN を最大 24 週間投与）は 55 例、第 2 治療群（ベピロビルセン 300 mg を 12 週間投与し、PegIFN を最大 24 週間投与）は 53 例であった。本試験では、ベピロビルセン投与後に PegIFN を投与した被験者を対象に臨床ウイルス学的解析を実施した（m5.3.5.4, B-Together VSR）。解析の要約を本項に示す。

4.3.7.1.B 結果

4.3.7.1.1.B 遺伝子型解析の結果

すべての被験者が試験開始時に NA 治療を受けていたため、HBV 全ゲノムシーケンシングに十分な HBV DNA 量が得られなかった。そのため、可能な場合には HBV RNA に由来する部分配列を代用し、解析を実施した。解析可能な HBV RNA に由来する部分配列（RT 及び／又は X 蛋白質コード領域を包含）は、ベースラインで 40 例、ベースライン後で 5 例から得られた。HBV GT の予測に用いたシーケンシングに加え、治験責任（分担）医師の報告から 15 例、血清型分類から 108 例の GT を特定した。

特定された HBV GT は 6 種類（A、B、C、D、E 及び H）であった。最も多く検出された GT は C（40 例、37%）であり、次いで D（34 例、31%）であった。有効性主要評価項目を達成した被験者の割合の GT 別の範囲は、0%～24%であった。ベピロビルセン投与終了時、

Confidential

及び PegIFN 投与終了時にウイルス学的効果が認められた被験者の割合の GT 別の範囲は、それぞれ 13%～50%及び 8%～35%であった。

いずれのシーケンシングデータからもベピロビルセン結合部位の多型は検出されず、ベピロビルセン結合部位以外で多型が検出された。標準的な GT A の参照配列と比較した結果、ベースラインでいずれかの治療群の 5 例以上の被験者から、RT 蛋白質領域のアミノ酸多型が 14 件、X 蛋白質領域のアミノ酸多型が 13 件検出された。ベピロビルセン投与後に 2 例以上で発現したベピロビルセン結合部位以外のアミノ酸多型はなかった。ベースラインで RT 蛋白質領域に NA 耐性多型が検出された被験者は 4 例であり、いずれの被験者も後観察期間の Week 24 にウイルス学的効果を示さなかった。

4.3.7.1.2.B 探索的なウイルス学的バイオマーカー（HBV RNA 及び HBcr 抗原）解析の結果

本試験で評価した HBcr 抗原量及び HBV RNA 量の平均値は、いずれの治療群でもベースラインから後観察期間の Week 24 にかけて時間経過に伴い低下した。第 1 治療群の被験者では、第 2 治療群と比較して HBcr 抗原量が大きく低下した。第 2 治療群の被験者では、第 1 治療群と比較して HBV RNA 量が大きく低下した。HBe 抗原陽性被験者では、HBe 抗原陰性被験者と比較して HBV RNA 量が大きく低下したが、HBcr 抗原量には差が認められなかった。

4.3.7.2.B B-Together 試験の臨床ウイルス学的解析の結論

- 本試験に組み入れられた被験者から特定された HBV GT は 6 種類（A、B、C、D、E 及び H）であった。最も多く検出された GT は C であり、次いで D であった。
- GT 間で、治療期間終了時及び後観察期間の Week 24 の、HBs 抗原のベースラインからの最大低下量及びウイルス学的効果が認められた被験者の割合の差は小さかった。
- ベースライン、ベースライン後及び試験治療下のいずれにおいても、ベピロビルセン結合部位の多型は特定されなかった。

4.3.8.B B-Fine 試験

B-Fine 試験は、安定した NA 治療を受けている HBe 抗原陰性の HBV 持続感染患者を対象に、肝臓の反復穿刺吸引細胞診による肝内免疫学的マーカー検査を行い、ベピロビルセンの治療メカニズムを検討する第 2a 相、多施設共同、非盲検、探索的試験であった。

本試験は単群試験であり、被験者にベピロビルセン 300 mg/mL を週 1 回 12 週間皮下投与した（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）。ベピロビルセンを 12 週間投与した後、後観察期間を 24 週間設定した。試験期間中、被験者は安定した NA 治療を継続した。本試験に組み入れた被験者は計 12 例であった。本試験では、臨床ウイルス学的解析を実施した（m5.3.5.4, B-Fine VSR）。解析の要約を本項に示す。

Confidential

4.3.8.1.B 結果

4.3.8.1.1.B 遺伝子型解析の結果

すべての被験者が試験開始時に NA 治療を受けていたため、HBV 全ゲノムシーケンシングに十分な HBV DNA 量が得られなかった。そのため、HBV 耐性モニタリング基準に該当したベースライン及びベースライン後の検体に対して、X 蛋白質のコード領域のみの HBV DNA/RNA シーケンシングを実施した。解析可能なシーケンシングデータは、ベースラインで 3 例、ベースライン後で 2 例から得られた。ベースラインとベースライン後で互いに対応するシーケンシングデータが得られ、ベピロビルセン投与後に発現した多型の評価が可能であった被験者は 2 例であった。

血清検体及び治験責任（分担）医師の報告から特定された GT は 3 種類（B、C 及び D）であった。また、scRNA シーケンシングから、追加で A 及び E の GT も特定されたため、特定された GT は計 5 種類（A、B、C、D 及び E）であった。すべての検査方法を通じて最も多く特定された GT は C（6 例、50%）であった。全被験者（12 例）から、1 つ以上の検査方法で GT のデータが得られた。治療期間終了時及び後観察期間の Week 24 のベースラインからの HBs 抗原の低下量の平均値に、GT 間で差が認められた。この結果は、被験者数が少ないことが起因した可能性がある。

ベースライン及びベースライン後のシーケンシングデータから、ベピロビルセン結合部位の多型は検出されなかった。解析された全シーケンシングデータから、ベピロビルセン結合部位以外（HBV X 蛋白質のコード領域）の多型が検出され、ベースラインで 3 例に V21I が認められた。また、ベピロビルセン投与後に発現したアミノ酸多型は 4 種類あり、各 1 例に認められた。ウイルス学的効果が認められた被験者から得たシーケンシングデータがなかったため、ベピロビルセン結合部位以外から検出された個々の多型と、治療期間終了時及び後観察期間の Week 24 のウイルス学的効果に、関連は認められなかった。

4.3.8.1.2.B 探索的なウイルス学的バイオマーカー（HBV RNA 及び HBcr 抗原）解析の結果

HBcr 抗原量の平均値は、ベースラインから後観察期間の Week 12 までに 1 $\log_{10}$ U/mL 低下した。HBV RNA は、ベースラインを含むすべての時点（Week 3 を除く）で検出されなかった。

4.3.8.1.3.B 肝臓の FNA 検体のシングルセル RNA シーケンシング

肝臓の FNA 検体をベースライン、治療期間及び後観察期間に採取し、10×Chromium のワークフロー（10×Genomics）を用いて scRNA シーケンシング解析を実施した。細胞タイプ別に Viral-Track 解析[Bost, 2020]を実施し、HBV ゲノムにマッピングされるリードを特定した。

scRNA シーケンシングにより、マクロファージ及び肝細胞等の主な細胞系統から HBV リードが検出された。scRNA シーケンシングで HBV リードが検出された被験者数は、ベースラインから試験終了にかけて減少した。全体的に、検出された HBV リードは少なく、この結果は NA による HBV の抑制、及び FNA 検体で特定された肝細胞数が少なかったことに起

Confidential

因すると考えられる。なお、肝細胞及びマクロファージの他にもすべての細胞系統からHBV リードが検出されており、検査の過程で ambient RNA のコンタミネーションが発生した可能性が示唆される。

4.3.8.2.B　B-Fine 試験の臨床ウイルス学的解析の結論

- 本試験に組み入れられた被験者から特定された HBV GT は 5 種類（A、B、C、D 及び E）であった。FNA 検体の scRNA シーケンシングを含むすべての検査方法を通じて最も多く検出された GT は C であった。
- HBV シーケンシング及び治験責任（分担）医師の報告から特定された GT 間で、HBs 抗原の低下量の平均値に差が認められた。この結果は、被験者数が少ないことが起因した可能性がある。
- ベースライン、ベースライン後及びベピロビルセン投与後のいずれにおいても、ベピロビルセン結合部位の多型は特定されなかった。

4.3.9.B　205695 試験（旧称 ISIS 505358-CS3 試験）

205695 試験は、未治療の HBV 持続感染患者を対象に、ベピロビルセンの安全性、忍容性、薬物動態及び抗ウイルス効果を評価する第 2 相、ランダム化、二重盲検、プラセボ対照、用量漸増試験であった。

本試験に組み入れた被験者は計 31 例であった。コホート 1～3 ではベピロビルセン 150 mg を計 6 例、ベピロビルセン 300 mg を計 12 例、プラセボを計 6 例に投与し、コホート 4（安定した NA 治療を受けている HBV 持続感染患者を対象とした探索的コホート）では NA 治療を継続しながら、ベピロビルセン 300 mg 及びプラセボをそれぞれ 5 例及び 2 例に投与した。本試験での臨床ウイルス学的解析（m5.3.5.4, 205695 VSR Amendment）の要約を本項に示す。

4.3.9.1.B　臨床ウイルス学に関する目的

本試験のウイルス学に関する目的は、ベピロビルセン及び NA を用いた HBV 治療に対する耐性の存在及び選択を、HBV ゲノムのヌクレオチドのシーケンシングで評価し、HBV DNA 量及び HBs 抗原量と探索的なウイルス学的バイオマーカー（HBV RNA 及び HBcr 抗原等）との相関を評価することであった。

4.3.9.2.B　検体及び方法

4.3.9.2.1.B　臨床検体の採取

耐性を評価するためのシーケンシング解析用血液検体を、ベースライン、Day 29 及び 113 に採取した。HBcr 抗原及び HBV RNA 解析用血液検体を、Day 1、29、57、85、113、169 及び 270 に採取した。

Confidential

4.3.9.2.2.B　ウイルス耐性の評価方法

コホート 1～3 では HBV DNA、コホート 4 では HBV RNA を対象にサンガーシーケンシングを実施した。得られたヌクレオチドのシーケンシングデータをアライメントし、最も類似性の高い GT の参照配列と比較した。

4.3.9.3.B　結果

4.3.9.3.1.B　遺伝型解析の結果

ヌクレオチドのシーケンシングデータは、26 例の 54 検体から得られた。HBV ゲノムから得たこれらのシーケンシングデータのうち、DNA 由来のデータは 52 件であり、残りの 2 件はコホート 4 の被験者から得られた RNA 由来のデータであった。ベースラインとベースライン後で互いに対応するシーケンシングデータが得られ、ベピロビルセン投与後に発現した変異の評価が可能であった被験者は 20 例であった。

シーケンシングデータの解析から、ベピロビルセン結合部位の変異は検出されなかった。ベースラインとベースライン後で対応するデータが得られた全被験者から、ベピロビルセン結合部位以外で、投与後に変異が検出された。変異の発現頻度は、ベピロビルセン群及びプラセボ群で同程度であった。ベピロビルセン投与後に変異が検出された被験者の、部位別の内訳は、X 蛋白質コード領域が 14 例、RT 蛋白質コード領域が 18 例であった。2 例超に共通して認められた変異はなかった。ベピロビルセンを投与された被験者から、NA 耐性変異は検出されなかった。プラセボを投与された未治療の 1 例（コホート 2）から、投与後の Day 29 に NA 耐性の可能性のある変異が検出された。

4.3.9.3.2.B　探索的なウイルス学的バイオマーカー（HBV RNA 及び HBcr 抗原）解析の結果

コホート 1 でベピロビルセン 150 mg を投与された被験者、及びコホート 2～3 でベピロビルセン 300 mg を投与された被験者では、コホート 1～3 のプラセボ群と比較して HBcr 抗原量の平均値が大きく低下した。コホート 4 では、HBcr 抗原量の平均値に時間経過に伴う変化は認められなかった。この結果は、コホート 4 の被験者は NA 治療を受けており、ベースラインの HBcr 抗原量が低かったことに起因している可能性がある。

コホート 1 でベピロビルセン 150 mg を投与された被験者、及びコホート 2～3 でベピロビルセン 300 mg を投与された被験者では、コホート 1～3 のプラセボ群と比較して HBV RNA 量の平均値が大きく低下した。コホート 4 では、多くの被験者で HBV RNA 量が<LLOQ 又は<LLOD であったため、HBV RNA 量の平均値の時間経過に伴う変化は認められなかった。

未治療の被験者では、ベピロビルセン投与により HBV RNA 量の平均値及び HBcr 抗原量の平均値がいずれも低下し、これらは HBs 抗原量と相関すると考えられた。

Confidential

4.3.9.4.B　205695 試験の臨床ウイルス学的解析の結論

ベースライン、ベースライン後及びベピロビルセン投与後のいずれからも、ベピロビルセン結合部位の多型は特定されなかった。

4.4.B 臨床免疫学

4.4.1.B　臨床免疫学に関する目的

複数のバイオマーカー（プロテオミクス、トランスクリプトミクス及びフローサイトメトリー等、試験により異なる）の解析の詳細を以下に要約する。これらの解析の目的は、ベースラインのエンドタイプの特徴、並びにベピロビルセン投与中及び投与後の免疫学的又は疾患バイオマーカーの変化の特徴を明らかにし、HBs 抗原量の低下、ALT 増加及び／又は有効性と相関するバイオマーカーを特定することであった。

4.4.2.B　205695 試験（旧称 ISIS 505358-CS3 試験）

4.4.2.1.B　205695 試験での臨床免疫学検体の概要

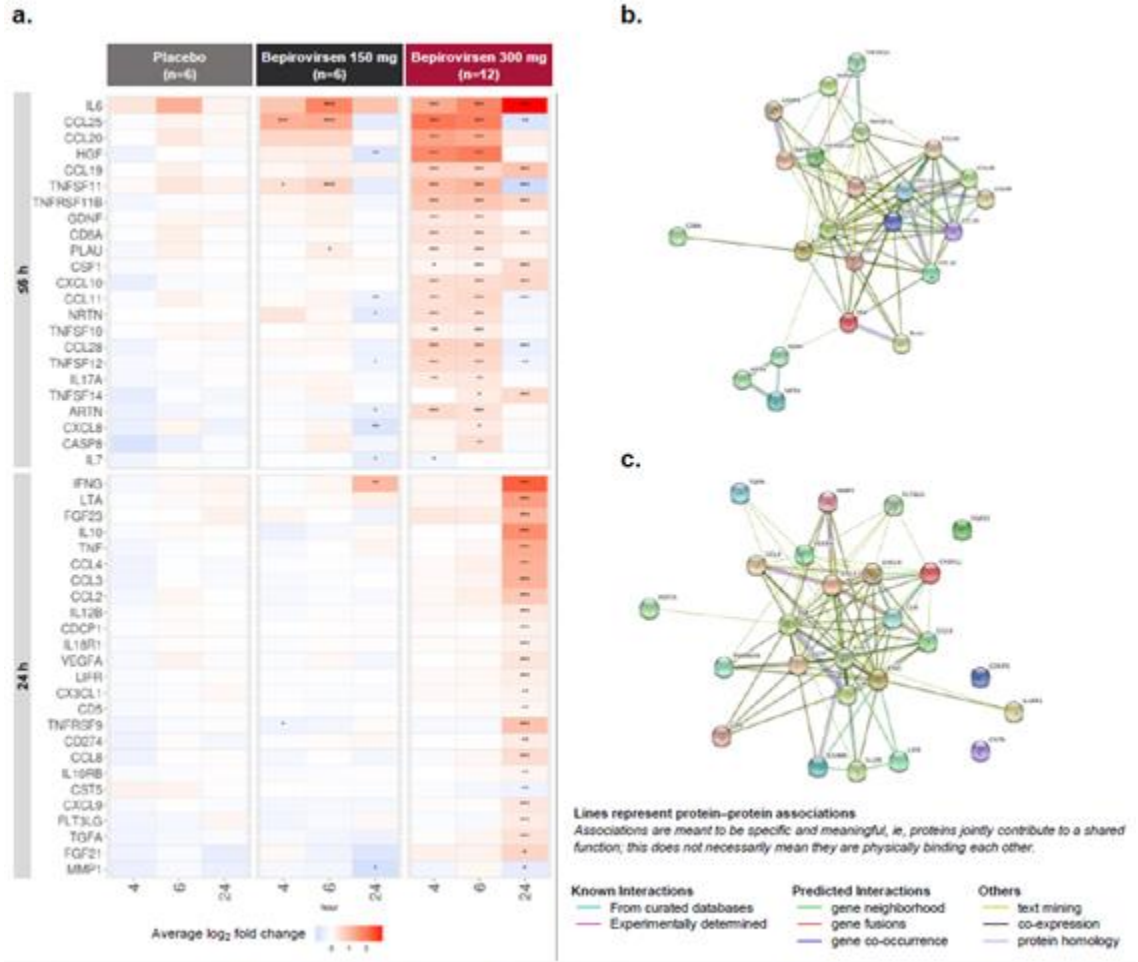
205695 試験は、HBV 持続感染患者へのベピロビルセンの反復投与（150 mg 又は 300 mg を 4 週間投与）を評価する第 2 相試験であった。本試験の CSR を m5.3.5.1 に示し、治療群の概要を含む臨床ウイルス学的解析の要約を Section 4.3.9.B に示す。本試験では、プロテオミクス（総 IgM 量等）及びフローサイトメトリー解析のための検体を採取した。検体の採取時点、方法及びデータ解析についての情報を、本試験のバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, 205695 Biomarker Report Amendment 1）に示す。

4.4.2.2.B　蛋白質の発現

ベピロビルセンの投与により、急性期蛋白質並びに自然免疫及び獲得免疫の活性化に関連する、サイトカイン及びケモカイン等（IL-12、TNF、IFNG、CXCL9 及び CXCL10 等）の蛋白質マーカーの発現が用量依存的に誘導された。一部の免疫マーカーは投与開始早期の 4 時間後に誘導され、その他は投与 24 時間後に認められた（図 11）。HBs 抗原量の低下と、一過性の ALT 増加及び免疫蛋白質マーカー（TLR8 活性化に関連するサイトカイン等）の上昇に相関が認められた。また、ALT は一連の免疫関連蛋白質の上昇とも相関し、これらの蛋白質の一部には HBs 抗原量の低下との相関も認められた。

Confidential

図 11 Plasma soluble protein analysis for ≤24 h response



†Analysis does not include samples from patients in the NA-treated cohort.
STRING, search tool for the retrieval of interacting genes/proteins.

Source: m5.3.5.4, 205695 Biomarker Report Amendment 1 Figure 8

4.4.2.3.B フローサイトメトリー（免疫学的マーカー検査）

被験者の PBMC に対してフローサイトメトリー解析を実施し、免疫細胞集団及びその表現型を特定した。ベピロビルセンを投与された被験者を、Day 29 の HBs 抗原の低下量に応じて分類した（低下なし：≤0.2 $\log_{10}$ IU/mL、部分的に低下：>0.2～≤2.0 $\log_{10}$ IU/mL、大きく低下：>2.0 $\log_{10}$ IU/mL）。治療期間中、HBs 抗原量が大きく低下した被験者では、低下なしの被験者と比較して PD1+及び GZMB+ CD8+ T 細胞が増加し、Day 29 の GZMB+ NK 細胞が増加する傾向が認められた。これらの結果から、HBs 抗原量が大きく低下した被験者では、CD8+ T 細胞の活性化並びに CD8+T 細胞及び NK 細胞の細胞傷害機能が増強されたことが示唆された。

臨床パラメータと免疫表現型パラメータを重ね合わせると、HBs 抗原量が大きく低下した被験者では、HBs 抗原量の低下及び ALT の増加と GZMB+ CD8+T 細胞及び NK 細胞の増加が同時に発現する傾向が認められた。この結果から、これらの細胞傷害性細胞が GZMB を用いて標的細胞を殺傷している可能性が仮説として考えられた。

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

HBs 抗原量が大きく低下した被験者では、低下なしの被験者と比較して、治験薬投与後期間のエフェクターメモリーT 細胞及び Ki67+ CD4+ T 細胞、並びに CD4+及び CD8+ T 細胞での TCF1 の発現が上昇する傾向が認められた。これらの結果から、治療反応が良好な被験者では、T 細胞の増殖がより活性化される可能性が示唆された。

4.4.2.4.B 総 IgM 量

総 IgM は初期の B 細胞活性化マーカーであり、HBV 非特異的（自然免疫の活性化を示す指標）である場合もあれば、HBV 特異的（抗原の制御）である場合もある。ベピロビルセンは総 IgM 量（プロテオミクスパネルの一部で測定）の用量依存的な上昇を誘導し、総 IgM 量は non responder（HBs 抗原量の低下が<0.2 $\log_{10}$ IU/mL）と比較して responder（HBs 抗原量の低下が>1.9 $\log_{10}$ IU/mL）でより大きく上昇すると考えられた。

4.4.2.5.B 結論

本試験では、ベピロビルセンの免疫メカニズムを特徴付けるため、複数の免疫学的アッセイを実施した。プロテオミクス解析により免疫マーカーの誘導が確認され、一部の免疫マーカーは投与開始早期の 4 時間後に誘導が認められた。これらの蛋白質の多くは、HBs 抗原量の低下及び／又は ALT の増加と相関した。また、免疫細胞の活性化マーカーである総 IgM 量の上昇、並びに T/NK 細胞の活性化、増殖及び／又は細胞傷害能の変化も認められた。これらの変化の一部は、HBs 抗原量が大きく低下した被験者で、より顕著に認められた。

4.4.3.B B-Clear 試験

4.4.3.1.B B-Clear 試験での臨床免疫学検体の概要

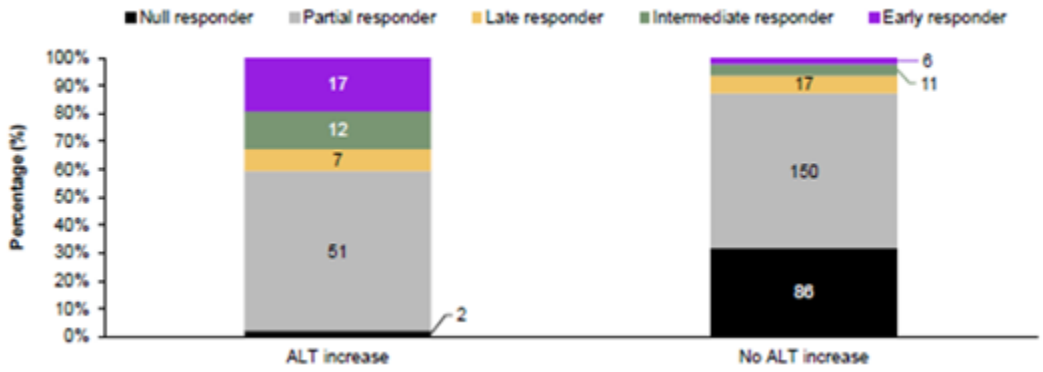
B-Clear 試験は、HBV 持続感染患者へのベピロビルセンの反復投与（24 週間投与）を評価する第 2b 相試験であった。本試験の CSR を m5.3.5.1 に示し、治療群の概要を含む臨床ウイルス学的解析の要約を Section 4.3.5.B に示す。本試験では、プロテオミクス（ALT 増加に関連する蛋白質発現等）、細胞内サイトカイン染色、フローサイトメトリー解析、ELF スコア/ProC3 量の測定及び総 IgM 量の定量のための検体を採取した。検体の採取時点、方法及びデータ解析についての情報を、本試験のバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, B-Clear Biomarker Report Amendment 1）に示す。

4.4.3.2.B ALT 増加に関連する蛋白質の発現

本試験では、一過性の ALT 増加（>3×ULN）が認められた。ALT 増加が認められた被験者では、null responder よりも early responder、intermediate responder 又は late responder が多く占めており、ALT 増加と HBs 抗原量の低下との関連性が示された［各 responder の定義を本試験のバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, B-Clear Biomarker Report Amendment 1 Table 2）に示す］（図 12）。ALT 増加が認められた被験者では、免疫及び炎症反応、並びに薬物代謝に関連するサイトカイン及びケモカイン等（CXCL10、CXCL9、IL-12 及び IL-10 等）の蛋白質マーカーの発現が上昇し、免疫活性化の可能性が示唆された。

Confidential

図 12　HBsAg response by ALT increase vs. no ALT increase



Source: m5.3.5.4, B-Clear Biomarker Report Amendment 1 Figure 2
ALT increase total n=89, No ALT increase total n=270

4.4.3.3.B　HBV 特異的な機能的 T 細胞の解析

被験者から分離した PBMC をオーバーラップペプチドプールで刺激し、HBV 特異的な T 細胞応答を測定した。試験期間中の被験者の応答は、おおむね複雑かつ多様であった。一部の被験者では、ベピロビルセン投与開始後、HBV ポリメラーゼ特異的 CD8+ T 細胞応答又は HBV コア抗原特異的 CD4+ T 細胞応答が強く認められた。CD4+ T 細胞応答は、主要評価項目の responder 及び non responder の両方に認められた［各 responder の定義を本試験のバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, B-Clear Biomarker Report Amendment 1）に示す］。しかし、一部の評価時点のデータが欠落しているため試験期間を通じたデータが不足しており、解釈には限界がある。

4.4.3.4.B　フローサイトメトリー

被験者の PBMC に対してフローサイトメトリー解析を実施し、免疫細胞集団及びその表現型を特定した。主要評価項目の responder では、null responder と比較して、ベピロビルセンの投与によって後観察期間中に一部の免疫細胞集団（T 細胞、B 細胞及び NK 細胞サブセット等）の頻度が上昇した［各 responder の定義を本試験のバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, B-Clear Biomarker Report Amendment 1）に示す］。Section 4.4.3.3.B で示した解析と同様に、本アッセイでは多くの評価時点でデータが欠落しており、解釈には限界がある。

4.4.3.5.B　ELF スコア及び ProC3 量

肝線維化の探索的マーカーとして、ELF スコア及び ProC3 量を測定した。On-NA 及び Not-on-NA コホートともに、ベースラインの ELF スコア及び ProC3 量の平均値は、ベピロビルセンの治療効果（SVR 達成の有無）を問わず、おおむね同程度であった。ELF スコアには、ベピロビルセンの投与終了までに上昇する傾向が認められたが、試験終了までにベースラインのスコアに戻る傾向が認められた。ProC3 量の平均値には、ベースラインからの大幅な変化は認められなかった。

Confidential

4.4.3.6.B 総 IgM 量

総 IgM は初期の B 細胞活性化マーカーであり、HBV 非特異的（自然免疫の活性化を示す指標）である場合もあれば、HBV 特異的（抗原量の制御）である場合もある。ベピロビルセンを投与された被験者では、総 IgM 量の平均値がベースラインから上昇した。いずれの評価時点でも、総 IgM 量のベースラインからの $\log_2$ 倍の上昇に、SVR の達成の有無との明確な関連は認められなかった。

4.4.3.7.B 結論

本試験では、ベピロビルセンの免疫メカニズムを特徴付けるため、複数の免疫学的アッセイを実施した。一過性の ALT 増加は、HBs 抗原量が<LLOQ となった被験者、特に HBs 抗原量の低下が早期に認められた被験者でより多く認められた。ALT 増加を示した被験者では、免疫活性化に関連する可溶性蛋白質の発現上昇が認められた。また、免疫細胞の活性化マーカーである T 細胞、B 細胞及び NK 細胞の頻度の変化、総 IgM 量の上昇、並びに HBV 特異的な CD4+及び CD8+ T 細胞応答の上昇も認められた。これらの変化の一部は後観察期間を通じて認められ、特に responder で顕著に認められた。

ベースライン又は試験期間を通じた ELF スコア又は ProC3 量と、有効性との相関は認められなかった。

4.4.4.B B-Clear 試験－探索的バイオマーカー解析

B-Clear 試験では Section 4.4.3.B で要約したバイオマーカー解析（m5.3.5.4, B-Clear Biomarker Report Amendment 1）に加えて、DIVI 又は eGFR 低下が認められた被験者を対象にバイオマーカーの探索的な追加解析を実施した。DIVI 及び eGFR 低下の定義を本試験の探索的バイオマーカー報告書（m5.3.5.4, B-Clear DIVI Cytokines Biomarker Report）に示す。

4.4.4.1.B DIVI 又は eGFR 低下が認められた被験者を対象とした可溶性バイオマーカー解析の概要

本解析では、DIVI が認められた被験者のサイトカインの発現量（Olink Explore 1536 のパネルで測定可能な 76 種類のサイトカイン）及び総 IgM 量のそれぞれについて、同一治療群の DIVI が認められなかった被験者と比較及び解析した。また、eGFR が 25%以上低下した被験者の総 IgM 量を、同一治療群の eGFR 低下が認められなかった被験者と比較し、解析した。各バイオマーカー解析の方法及びデータ解析に関する詳細を探索的バイオマーカー報告書（m5.3.5.4, B-Clear DIVI Cytokines Biomarker Report）に示す。

4.4.4.1.1.B 蛋白質（サイトカイン）の発現解析

DIVI が認められた被験者のサイトカインの発現量をレビューし、DIVI が認められなかった被験者のサイトカインの発現量と比較した結果、ベースライン又は試験期間を通じて DIVI とサイトカインの発現量に明確な関連は認められなかった。

Confidential

4.4.4.1.2.B 総 IgM 量

DIVI 又は eGFR 低下が認められた被験者の総 IgM 量をレビューし、DIVI 又は eGFR 低下が認められなかった被験者の総 IgM 量と比較した結果、ベースライン又は試験期間を通じて DIVI 及び eGFR 低下と総 IgM 量に明確な関連は認められなかった。

4.4.4.1.3.B 結論

本解析では、DIVI の有無によるサイトカインの発現量及び総 IgM 量の比較、並びに eGFR 低下の有無による総 IgM 量の比較を実施した。全体的に、これらの比較から明確な傾向は特定されなかった。

4.4.4.2.B DIVI が認められた被験者を対象とした遺伝子解析の概要

本解析では、PGx 解析対象集団に含まれる被験者のうち、臨床徴候及び症状に関連する DIVI が認められた被験者と認められなかった被験者を比較し、8 種類の *TLR8* 遺伝子多型を評価した。PGx 解析対象集団の詳細についてはバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, B-Clear DIVI Genetics Biomarker Report）の Section 3.1 に示す。

4.4.4.2.1.B 解析の要約

B-Clear 試験では、対象となる被験者数が限られるため、遺伝学的要因に関する正式な統計学的仮説検定の実施は困難であった。そのため、事前に特定した *TLR8* の遺伝子多型を対象に、記述的に評価した。PGx 解析対象集団で、治験実施計画書で規定した定義に合致する臨床徴候及び症状に関連する DIVI が認められた被験者は 5 例であり、いずれも女性であった。PGx 解析対象集団で DIVI が認められなかった被験者は 302 例であった。全体的に、DIVI の有無による *TLR8* 遺伝子型に明確な記述的差異は認められなかった。

4.4.5.B B-Together 試験

4.4.5.1.B B-Together 試験での臨床免疫学検体の概要

第 2b 相試験である B-Together 試験では、安定した NA 治療を受けている被験者にベピロビルセンを最大 24 週間投与した後、PegIFN を最大 24 週間投与した時の HBs 抗原量の陰性化率が上昇するかを評価するとともに、PegIFN 投与終了後のウイルス学的効果が持続するかを評価した（m5.3.5.1, B-Together CSR）。また、本試験の用法・用量で投与した時のベピロビルセンの安全性及び忍容性を評価した。

本試験では、血清プロテオミクス（総 IgM 量の定量等）、全血トランスクリプトミクス、フローサイトメトリー解析及び ELF スコア／ProC3 量測定用検体を採取した。検体の採取時点、方法、目的、データ解析及び結果の詳細に関する情報を、本試験のバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, B-Together Biomarker Report）に示す。

Confidential

4.4.5.2.B　治療群間で認められたベースラインの免疫学的バイオマーカーの不均一性

本試験の主要評価項目を達成した被験者の割合は、第 1 治療群で 9%及び第 2 治療群で 15%であった。治療群間の疾患の不均一性を考慮し、ベースラインでの被験者の免疫学及びその他の疾患に関連する潜在的な差を評価するため、プロテオミクス解析を実施した。第 2 治療群の被験者のサブセットでは、第 1 治療群と比較して発現量の高い蛋白質が 148 種類認められた。パスウェイ解析の結果、これらの 148 種類の蛋白質が、アポトーシス及び免疫応答に関連する経路に多く含まれていることが示された。

4.4.5.3.B　ベピロビルセンの薬力学的効果としての免疫活性化

ベピロビルセンを投与された全被験者について、各治療群及び治療反応別の部分集団内での蛋白質の相対発現量の平均値を解析した結果、Week 3 にサイトカイン及び免疫関連蛋白質（自然免疫応答及び獲得免疫応答の一部として機能する TNFα、IL-10 及び IL-12 等）の上昇が認められた。B-Clear 試験のプロテオミクスデータセットに基づく追加解析から、同期間内にプラセボを投与された被験者ではこれらの蛋白質の上昇が認められなかったため、ベピロビルセン投与による影響であることが示唆された。更に、両治療群のベピロビルセンを投与された被験者では、治療反応別の部分集団に関わらず、免疫細胞増殖（TYMS、CCNB2、H2BC14）及び B 細胞応答（MS4A1、IL-7、PLEKGH1）に関連する全血中の RNA 転写産物が Week 5 に顕著に上昇した。この転写産物データと一貫して、Week 5 に獲得免疫である CD8+細胞傷害性 T 細胞及び B 細胞が増殖及び活性化する傾向が認められた（m5.3.5.4, B-Together Biomarker Report Figure 13）。また、ベピロビルセン投与中に多くの被験者で総 IgM 量が一様に上昇し、B 細胞応答の活性化が更に裏付けられた。一方で、免疫活性化がベピロビルセンのウイルス学的効果の唯一の決定因子ではないことは明確であり、免疫活性化の他に、ベースラインの HBs 抗原量[Yuen, 2022]、NA 治療の種類[Yuen, 2022; Buti, 2025]、及びその他の未解明の要因等、複数の様々な因子がウイルス学的効果に影響を及ぼすと考えられる。

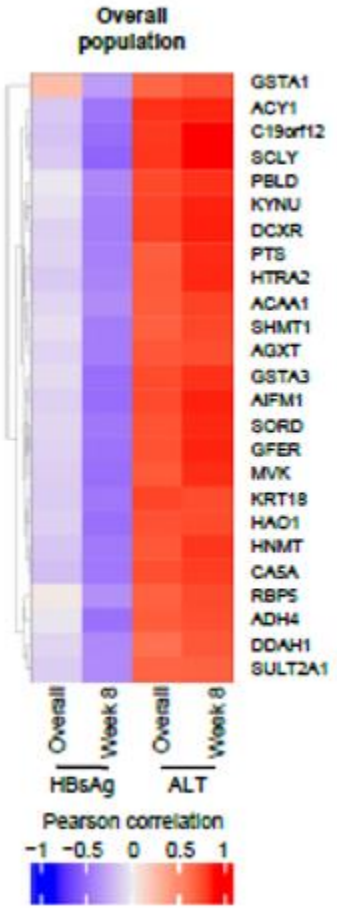
4.4.5.4.B　ALT と肝細胞死及び治療反応との関連性

Week 8 のベピロビルセンを投与された responder のデータから、肝細胞アポトーシスの促進を間接的に示すエビデンスが認められた。肝細胞にはミトコンドリアが多く含まれ[Wiesner, 1992]、肝障害が生じると血清中ミトコンドリア酵素が上昇する[Frederiks, 1984]。Responder の血清中では、肝障害のマーカーである ALT の増加と同時に、AIFM1、KRT18 及び HTRA2 等のアポトーシスに特異的なマーカー、及び ADH4、CA5A 及び AGXT 等の肝特異的な蛋白質の蓄積が認められ、これらの一部の蛋白質はミトコンドリアに特異的であることから、肝細胞死の発現が示唆された（図 13 及び図 14）。特に、ALT、AIFM1、KRT18、ADH4 及び CA5A の増加は、non responder と比較して responder で多く、null responder では増加がほぼ認められなかった［各 responder の定義を本試験のバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, B-Together Biomarker Report）に示す］。この結果は、これらの蛋白質の上昇がベピロビルセン投与の治療反応であるという仮説を裏付けるものである。更に、responder サブセットの血清では、HBV DNA 量及び ALT の一過性の増加が HBs 抗原量の低

Confidential

下と同期するパターン（図 15 及び図 16）が認められ、null responder の一部ではこのパターンが認められなかった。この結果は、ベピロビルセンが HBV 感染肝細胞の細胞死に関与し、ウイルス学的効果をもたらすことを示すエビデンスである。一方で、結論付けるには十分ではないものの、これらのデータはベピロビルセンによる肝細胞死が非特異的であることを示唆するものではない。本解析は少数の被験者を対象とした付随的なものであるため、今後のベピロビルセンの試験で対象を拡大し、本解析の結果を確認する必要がある。

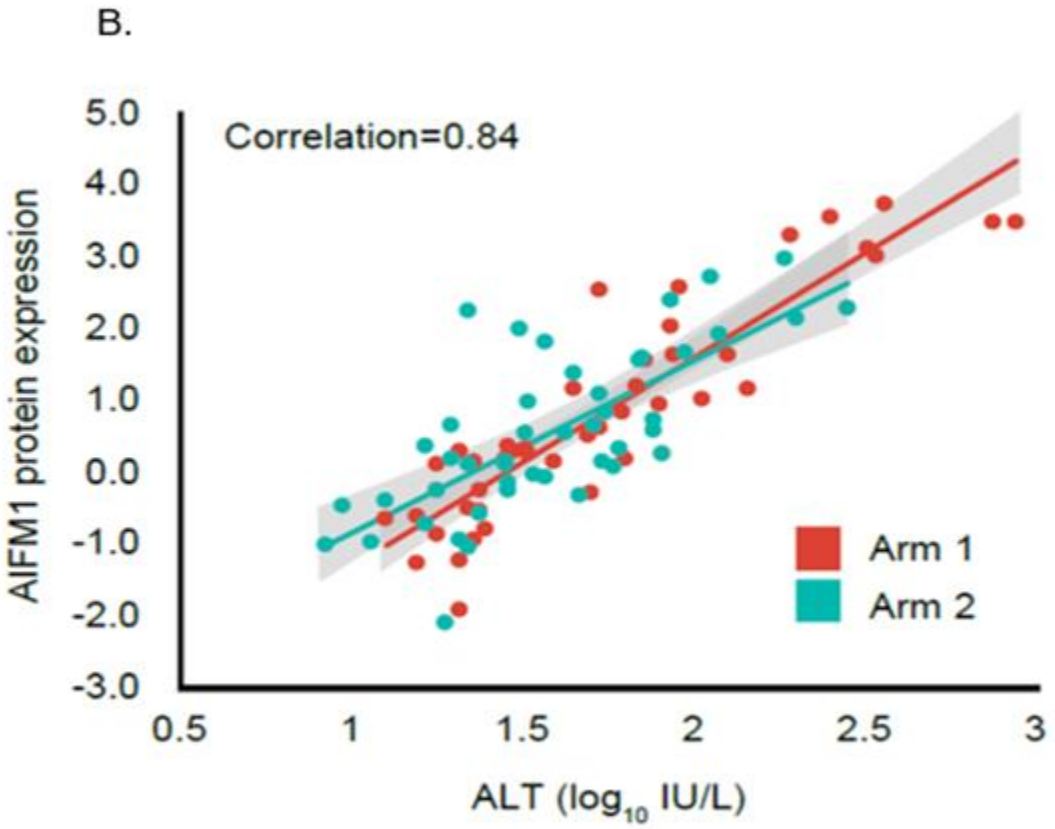
図 13　Correlation heatmap of apoptosis and liver-specific protein expression with ALT and HBsAg levels



Source: m5.3.5.4, B-Together Biomarker Report Figure 20

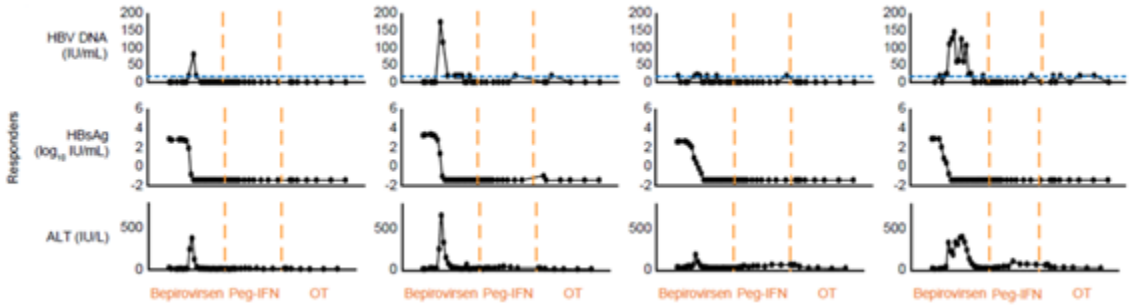
Confidential

図 14 Correlation between AIFM1 expression and ALT levels



Source: m5.3.5.4, B-Together Biomarker Report Figure 21

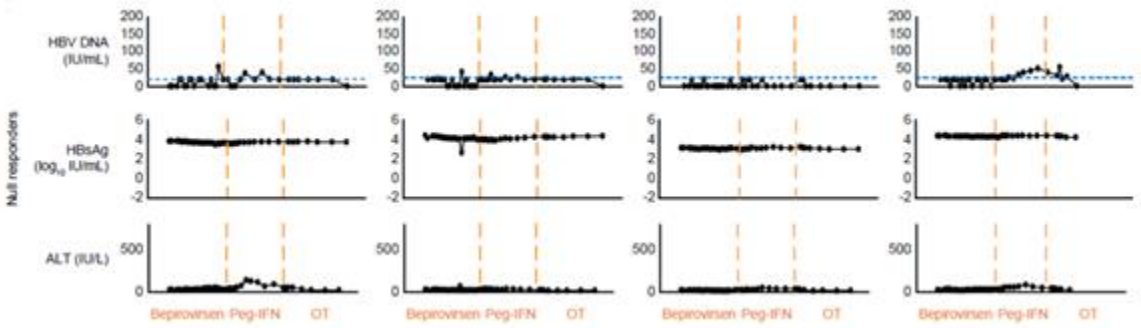
図 15 Longitudinal levels of HBV DNA, HBsAg and ALT over time in selected responders from Arm 1



Source: m5.3.5.4, B-Together Biomarker Report Figure 23

Confidential

図 16　Longitudinal levels of HBV DNA, HBsAg and ALT over time in null responders from Arm 1



Source: m5.3.5.4, B-Together Biomarker Report Figure 24

4.4.5.5.B　肝線維化への影響

ベースラインの ELF スコアと ProC3 量は、responder 集団間で同程度であった。治療期間中、わずかな可逆的変化が認められた。本試験で肝線維化マーカーの解析用検体が得られた被験者のうち、試験終了時に ELF スコア及び ProC3 量がベースラインの値を下回った被験者の割合は 30%であった。本試験では被験者数が少なかったため、これらの変化の臨床的意義については今後検討が必要である。

4.4.5.6.B　結論

本試験の解析の主な結論を以下に示す。本試験は比較的小規模であるため、これらの結論は、他の試験で確認が必要である。

- 血清サイトカインの発現量上昇及び免疫細胞の活性化／増殖といったエビデンスから、ベピロビルセンによる免疫応答の誘導が示された。
- ALT 増加は responder で多く認められ、肝臓及びアポトーシスに特異的なマーカーと関連しており、肝細胞アポトーシスによる細胞死の発現が示唆された。
- 一過性の ALT 増加は HBs 抗原量の低下と関連しており、一過性の ALT 増加がベピロビルセンの治療反応であるという仮説が裏付けられた。
- HBV DNA 量及び ALT の一過性の増加が同時に認められたことから、肝細胞死には HBV 感染肝細胞の細胞死が含まれると考えられる。HBV 感染肝細胞の細胞死は、ベピロビルセンの下流効果である可能性がある。
- ベピロビルセン投与後に PegIFN を投与する sequential 療法は、肝線維化マーカーに有害な影響を及ぼさなかった。

4.4.6.B　B-Fine 試験

4.4.6.1.B　B-Fine 試験での臨床免疫学検体の概要

B-Fine 試験は、ベピロビルセンの治療メカニズムを検討する第 2a 相、非盲検、探索的試験であった。安定した NA 療法を受けている HBV 持続感染患者 11 例（HBs 抗原量 >100 IU/mL）に、ベピロビルセンを週 1 回 12 週間投与（Day 4 及び 11 に負荷投与を実施）

Confidential

し、その後 24 週間（Week 36 まで）の後観察を実施した。本試験の CSR を m5.3.5.1 に示し、治療群の概要を含む臨床ウイルス学的解析の要約を Section 4.3.8.B に示す。本試験では、血清プロテオミクス、PBMC のフローサイトメトリー解析、ELF スコア／ProC3 量の測定、総 IgM 量の定量及び全血 RNA シーケンシングのための末梢血検体を採取した。また、反復 FNA により、scRNA シーケンシング用検体を採取した。これらのデータの解析から、HBs 抗原及び HBs 抗体等のウイルス学的バイオマーカーを評価した。検体の採取時点、方法及びデータ解析（各 responder の定義を含む）についての情報に加え、本試験の限界（小規模な被験者集団、並びに治療反応及び解析に用いた検体の違い等であるが、これらに限定されない）についての詳細を、本試験のバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, B-Fine Biomarker Report）に示す。

4.4.6.2.B　全被験者での全体的な結果の要約

本試験の以下に示す結果から、ベピロビルセンの投与開始後、HBs 抗原量の変化に関わらず液性免疫応答が認められることが示された。

- 全血 RNA シーケンシングデータから、B 細胞の活性化及び免疫グロブリンの転写が示された。
- 血清プロテオミクスから、B 細胞の活性化と一致するデータが得られた。
- PBMC のフローサイトメトリー解析から B 細胞の増殖が示されたが、CD19+ B 細胞集団の全体的な広がりは認められなかった。この B 細胞の増殖は、B-Together 試験で認められた結果（Section 4.4.5.3.B）と一致した。
- 多くの被験者で総 IgM 量が上昇した。
- HBs 抗体量は complete responder で最も高く、HBV 特異的な液性免疫応答が示された。
- 肝 FNA で採取した肝 B 細胞の scRNA シーケンシングから、B 細胞の活性化が示された。
- 肝臓の scRNA シーケンシングデータから、形質細胞集団が変化している可能性が示唆された（形質芽球／形質細胞は本来希少であり、このエビデンスは 1 例から得られた）。

その他の結果を以下に示す。

- 全血 RNA シーケンシングのデータから、細胞増殖の促進が示唆された。
- 血清プロテオミクスのデータから、自然免疫の活性化が示唆された。
- データが得られた被験者では、GZMB+CD8+ T 細胞の頻度が治療期間中に上昇し、試験終了時も高いままであった。
- 肝臓の scRNA シーケンシングと PBMC のフローサイトメトリー解析との間で一貫した所見が認められ、relapser 及び high partial responder ではベースラインの非定型メモリー B 細胞の頻度が高いことが示された。
- ELF スコア及び ProC3 量と治療反応に明確な相関は認められなかった。

Confidential

4.4.6.3.B Complete responder の結果

Complete responder（本試験中に血清 HBs 抗原量が<LLOQ となり、その後の試験期間中も<LLOQ が持続）として特定された被験者は 2 例（被験者番号 [redacted] 及び [redacted]）であった。いずれの被験者でも、試験期間中に最も高い HBs 抗体の誘導が認められ、ベピロビルセン投与中に ALT が増加した。

- PBMC フローサイトメトリー（被験者番号 [redacted] のみから試験期間を通じたデータが得られた）
  - B 細胞
    - ベピロビルセン投与中に PD1+ B 細胞及び Ki67+ B 細胞が増加し、B 細胞の活性化及び増殖が示された。
    - 試験を通じて古典的メモリーB 細胞の頻度が比較的高かった。また、試験終了時までに活性化メモリーB 細胞が増加した。
  - T 細胞
    - ベピロビルセン投与後、細胞傷害性の（GZMB+）CD8+ T 細胞の頻度が上昇した。
    - ベピロビルセン投与中及び試験終了時までに、細胞増殖に関連する（Ki67+）CD4+ T 細胞が増加した。
    - ベースライン及び試験期間を通じて、TEMRA CD4+ T 細胞及び TEMRA CD8+ T 細胞の頻度が上昇した。
    - ベースライン及び試験期間を通じて、PD1+ CD4+ T 細胞及び PD1+ CD8+ T 細胞の頻度は比較的低かった。
  - NK 細胞
    - ベピロビルセン投与中に、細胞傷害性の CD56lo NK 細胞の頻度が上昇し、サイトカインを産生する CD56hi NK 細胞の頻度が低下した。
- 肝 FNA 検体の scRNA シーケンシング
  - B 細胞
    - 被験者番号 [redacted] で、ALT の最高値が認められた時点及び HBs 抗体量がわずかに上昇した時点と同時期に未熟な形質芽球の発現が認められた。
    - いずれの被験者でもベースラインにおける非定型メモリーB 細胞の頻度が最も低く、被験者番号 [redacted] ではベピロビルセン投与中に頻度が上昇した。
  - NK 細胞
    - 被験者番号 [redacted] では、CD56dim NK 細胞の頻度が上昇し、組織常在 NK 細胞の頻度が低下した。
    - 被験者番号 [redacted] では、HBs 抗原量の低下に伴い、CD56dim NK 細胞の TGFβ、IFN、シグナル伝達及び細胞傷害性に関連した分子経路に変化が認められた。
    - 被験者番号 [redacted] では、HBs 抗原量の低下に伴い、組織常在 NK 細胞のシグナル伝達に変化が認められた。この変化は、AP-1 複合体の構成要素である *FOS* の発現上昇から裏付けられた。

Confidential

- マクロファージ
  - いずれの被験者でも、マクロファージ系統サブクラスターのうち、ベースラインの相対頻度が最も高かったものはマクロファージサブクラスターであった。被験者番号[redacted]では、ベピロビルセン投与後に頻度が上昇した。
- 樹状細胞（被験者番号[redacted]のみからデータが得られた）
  - 樹状細胞集団内の抗原処理又はその制御が、HBs 抗原量の低下の程度と関連している可能性が示された。

Complete responder のこれらの結果から、ベピロビルセンの投与開始後、及び HBs 抗原量が低下する過程を通じて、末梢血及び肝臓における動的な免疫変化が示唆された。この変化には、Section 4.4.6.2.B で考察した液性免疫の生産的な応答が含まれる可能性がある。

4.4.6.4.B 結論

本試験の解析から、B 細胞の活性化及び免疫グロブリンの産生に関わる遺伝子及び／又は蛋白質の発現上昇、B 細胞増殖の促進、総 IgM 量の上昇、HBV 特異的な抗体の検出、並びに肝 B 細胞集団のトランスクリプトーム変化が示され、ベピロビルセン投与が治療反応に関係なく液性免疫応答を誘導することが示唆された。

本試験で complete responder であった 2 例から得られた結果から、末梢血及び肝臓のいずれのコンパートメントでも動的な免疫変化が示され、ベピロビルセンによる HBs 抗原量の低下に関する免疫活性化の役割が示唆された。

これらの解析は、今後、より大規模な患者集団を対象に本試験の予備的な結果を検証し、ベピロビルセン投与により誘導される免疫メカニズムの理解を深めるための指針になると考えられる。

4.4.7.B 219239 試験

4.4.7.1.B 219239 試験の臨床免疫学的検体の概要

219239 試験は、健康被験者を対象にベピロビルセン 300 mg をバイアル及び PFS SSD で単回皮下投与した時の相対的バイオアベイラビリティを評価する、第 1 相試験であった。本試験の CSR を m5.3.1.2 に示す。本試験では、プロテオミクス解析用の検体を採取した。評価時点、解析方法及びデータ解析の詳細を本試験のバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, 219239 Biomarker Report）に示す。

4.4.7.2.B 蛋白質発現解析

ベピロビルセン単回投与後、ベースラインからの DEP の最高値は投与 8～12 時間後に認められ、PK プロファイルと同様の変化を示した。一方、自然免疫関連蛋白質の最高値は 24 時間後に認められた。

クラスター解析により、類似の時間的発現パターンを有する蛋白質群の存在が示された。異なる時間的発現パターンを示す 4 つの蛋白質クラスターが特定され、このうち 2 つは特に注目すべきクラスターであった。クラスター1 の蛋白質は、ベピロビルセン投与から誘導ま

Confidential

での時間が長く、投与 12 時間後に発現が上昇した。このクラスターには、免疫応答及び脂質応答に関与する蛋白質が含まれた。一方で、クラスター4 の蛋白質は、PK プロファイルと類似する急速かつ一過性の発現の上昇を示した。本クラスターには、細胞外マトリックス、WNT シグナル伝達及び免疫応答の調節に関与する蛋白質が含まれた。クラスター4 の蛋白質発現が低下する時点は、クラスター1 の蛋白質発現が上昇する時点と一致した。

エンリッチメント解析により、IL-10 及び IL-12 を含む複数の免疫経路が特定され、投与 24 時間及び 48 時間後で強い免疫活性化が示された。TLR の下流蛋白質の発現はベピロビルセン投与後に上昇し、投与 24～48 時間後に最高値が認められた。

ベピロビルセン投与後の免疫関連蛋白質の発現パターンには、本試験（219239 試験）と 205695 試験で高い相関が認められ、HBV の有無にかかわらず、ベピロビルセン投与により免疫応答が刺激されることが示された。

4.4.7.3.B　結論

219239 試験では、健康被験者にベピロビルセン 300 mg を単回投与し、ベピロビルセンの免疫メカニズムを明らかにする目的でプロテオミクス解析を実施した。解析の結論を以下に示す。

- 投与後急性期の評価時点で、異なる蛋白質誘導のパターンが複数認められた。
- 投与 24～48 時間後に、免疫経路の誘導が認められた。
- ベピロビルセンの自然免疫刺激作用は、HBV の有無に依存しなかった。

4.4.8.B　205873 試験

4.4.8.1.B　205873 試験の臨床免疫学的検体の概要

205873 試験は、健康被験者を対象に臨床用量よりも高用量のベピロビルセンを投与した時の心臓伝導、PK、安全性及び忍容性への影響を評価する第 1 相試験であった。本試験の CSR を m5.3.5.4 に示す。本試験では、プラセボ又はベピロビルセン 450 mg を単回投与した被験者からプロテオミクス解析用の検体を採取した。評価時点、解析方法及びデータ解析の詳細を本試験のバイオマーカー報告書（m5.3.5.4, 205873 Biomarker Report）に示す。

4.4.8.2.B　蛋白質発現解析

205695 試験（Section 4.4.2.2.B）で同定された蛋白質群の解析を 205873 試験でも実施した結果、219239 試験（Section 4.4.7.2.B）と同様に、これらの蛋白質の誘導が認められた。HBV 持続感染患者（205695 試験）で認められたプロテオミクスの変化が、健康被験者（219239 試験及び 205873 試験）でも認められたことから、ベピロビルセンの免疫刺激作用は HBV のウイルス成分の有無に依存しないことが示された。

205873 試験で特定された DEP（免疫関連蛋白質を含む）の多くは、ベピロビルセン 150 mg（205695 試験）、300 mg（219239 試験）及び 450 mg（205873 試験）と用量の増加に伴い上昇した。

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

205873 試験の全期間を通じた、Olink Explore 1536 アッセイに基づく探索的なタイムコース解析から、ベピロビルセン 450 mg 投与により蛋白質発現量の顕著な変化が認められ、その変化は投与後 72 時間にわたり異なる動態パターンを示した。一方、プラセボ群での変化は比較的小さかった。投与後 2 時間以内に、ケモカイン（CCL25、CCL26）を含む蛋白質の発現量が急速に上昇し、自然免疫及び獲得免疫細胞の動員への寄与が示唆された。次いで、別の蛋白質群の発現が上昇し、投与 12 時間後までに最高値に達した。この蛋白質群には、リンパ球を動員する別のケモカイン（CCL20、CCL28、XCL1、及び B 細胞を動員する CXCL13）が含まれた。最後に、投与 24 時間後以降、別の蛋白質群の発現量が上昇し始めた。この蛋白質群には、幅広い自然免疫及び獲得免疫細胞（B 細胞、T 細胞、マクロファージ、樹状細胞及び NK 細胞等）を活性化するサイトカイン（IL-27、TNF、IFNG）が含まれ、更に T 細胞（CCL19、CXCL9）又は単球（CCL3、CCL4）の動員に寄与するケモカインが含まれた。これらの結果から、ベピロビルセンが免疫応答を動的に誘導する段階が複数回存在することが示唆された。

免疫関連蛋白質のサブセットを定量アッセイで測定した結果、Olink Explore 1536 プラットフォームと同様の結果が認められ、サイトカイン及びケモカインを含む多くの蛋白質の発現促進がタイムコース全体で認められた。Olink Explore 1536 アッセイと定量アッセイの相関を解析した結果、多くの蛋白質で高い一致性が認められた。

4.4.8.3.B 結論

205873 試験では、健康被験者にプラセボ又はベピロビルセン 450 mg を単回投与し、ベピロビルセンの免疫メカニズムを明らかにする目的でプロテオミクス解析を実施した。解析の結論を以下に示す。

- 本解析の結果から、219239 試験（Section 4.4.7.B）で示された、ベピロビルセンの自然免疫刺激作用は HBV の有無に依存しないという知見が裏付けられた。
- 205695 試験及び 219239 試験を含む統合解析から、ベピロビルセンが蛋白質バイオマーカーに用量依存的な影響を及ぼすことが示された。おおむね、高用量で誘導が強くなる傾向が認められた。
- 蛋白質誘導の動態パターンから、ベピロビルセンが自然免疫及び獲得免疫細胞両方を動員及び活性化する段階が、複数回存在することが示唆された。

4.5.B 臨床ウイルス学の結論

全体的に、現時点でベピロビルセンに対する潜在的な耐性は限定的であることが示唆された。

B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験でベピロビルセンを投与された被験者のうち、ベピロビルセン結合部位の塩基に多型が認められた被験者の割合、及びそれらのうち FC を達成した被験者の割合を表 19 に示す。B-Together 試験、B-Fine 試験、205695 試験及び B-Sure 試験の Not-on-NA コホートでは結合部位の多型は認められなかった。B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験で結合部位の多型が認められた被験者の割合は低く、B-Clear 試験の On-NA 集団及び B-Sure 試験の On-NA 集団で認められた結果と一貫していた。B-Well 1 試験及び B-Well 2 試験

Confidential

2.7.2.4. 特別な試験

並びに B-Clear 試験で結合部位に多型が認められた被験者では、野生型配列が認められた被験者と比較して HBs 抗原量の低下が少なかったが、一部の被験者では HBs 抗原の不検出又は FC を達成した。試験治療下で認められたベピロビルセン結合部位の多型は少なく、ベピロビルセンを投与された被験者及びプラセボを投与された被験者の両方で認められた。

表 19　Bepirovirsen-treated participants with nucleotide polymorphisms in the bepirovirsen binding site and associated functional cure rate

	Baseline		Treatment emergent	
	Nucleotide polymorphisms % (n/N[a])	Functional cure % (n/ N[b])	Nucleotide polymorphisms % (n/ N[c])	Functional cure % (n/N[b])
Participants with Baseline HBsAg ≤3000 IU/mL				
B-Well 1	6% (7/123)	0% (0/7)	5% (2/42)	0% (0/2)
B-Well 2	7% (7/104)	29% (2/7)	6% (2/31)	0% (0/2)
Participants with Baseline HBsAg ≤1000 IU/mL				
B-Well 1	3% (2/69)	0% (0/2)	5% (1/22)	0% (0/1)
B-Well 2	12% (6/50)	33% (2/6)	0% (0/10)	0[d]

Source: Section 4.3.3.4.B and Section 4.3.3.5.B
[a]N = number of participants with Baseline HBV sequence
[b]N = number of participants with nucleotide polymorphisms in the binding site of their HBV sequence
[c]N = number of participants with paired Baseline and post-Baseline HBV sequences
[d]There were no participants with treatment emergent polymorphisms in this category so the denominator was 0.

一部の一塩基多型を対象とした *in vitro* 試験では、野生型に対して EC50 の変化倍率が 1.2～4.1 であると示された。ベピロビルセンに対する感受性低下が及ぼす臨床的影響は不明である。また、ベピロビルセンに対する反応は多因子性であると考えられる。進行中の試験及び今後の試験により、ベピロビルセンの耐性プロファイルがより明確になると考えられる。

参考文献

Bost P, Giladi A, Liu Y, et al. Host-Viral Infection Maps Reveal Signatures of Severe COVID-19 Patients. Cell. 2020;181(7):1475-88.e12.

Buti M, Heo J, Tanaka Y, et al. Sequential Peg-IFN after bepirovirsen may reduce posttreatment relapse in chronic hepatitis B. J Hepatol. 2025;82(2):222-34. Epub 2024 Aug 29. PMID: 39214467.

Decorsière A, Mueller H, van Breugel PC, et al. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. Nature. 2016;531(7594):386-89.

Delaney WE 4th, Ray AS, Yang H, et al. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(7):2471-77.

Frederiks WM, Vogels IM, Fronik GM. Plasma ornithine carbamyl transferase level as an indicator of ischaemic injury of rat liver. Cell Biochem Funct. 1984;2(4):217-20. doi:10.1002/cbf.290020407.

Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, et al. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. J Virol. 1995;69(10):6158-69.

Confidential

Hayer J, Jadeau F, Deléage G, et al. HBVdb: a knowledge database for hepatitis B virus. nucleic acids res. 2013;41(Database issue):D566-70.

Innaimo SF, Seifer M, Bisacchi GS, et al. Identification of BMS-200475 as a potent and selective inhibitor of hepatitis B virus. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(7):1444-48.

Menendez-Arias L, Alvarez M, Pacheco B. Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. Curr Opin Virol 2014; 8C: 1-9.

Murphy CM, Xu Y, Li F, et al. Hepatitis B virus X protein promotes degradation of SMC5/6 to enhance HBV replication. Cell Rep. 2016;16(11):2846-54.

Panjaworayan N, Roessner SK, Firth AE, et al. HBVRegDB: annotation, comparison, detection and visualization of regulatory elements in hepatitis B virus sequences. Virol J. 2007 Dec 17;4:136.

Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(4):1005-9.

Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. Hepatology. 2001 Mar;33(3):751-57.

van Breugel PC, Robert EI, Mueller H, et al. Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. Hepatology. 2012;56(6):2116-24.

Wiesner RJ, Ruegg JC, Morano I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. Biochem Biophys Res Commun. 1992;183(2):553-9.

Wooddell CI, Yuen MF, Chan HL, et al. RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. Sci. Transl. Med. 2017, 9.

Yu Y, Schneider WM, Kass MA, et al. An RNA-based system to study hepatitis B virus replication and evaluate antivirals. Sci Adv. 2023;9(15):eadg6265.

Yuen MF, Lim SG, Plesniak R, et al. Efficacy and Safety of Bepirovirsen in Chronic Hepatitis B Infection. N Engl J Med. 2022 Nov 24;387(21):1957-68.

Zhang X, Chen X, Wei M, et al. Potential resistant mutations within HBV reverse transcriptase sequences in nucleos(t)ide analogues-experienced patients with hepatitis B virus infection. Sci Rep. 2019;9(1):8078. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44604-6.

Confidential

5.B付録

表 20 List of bepirovirsen nonclinical virology studies

Type of study	Species (strain)/test system	Method of administration	Form	GLP	Testing facility	Report no. (study no.)	2.7.2.4 Section
Identification and in vitro anti-HBV activity of ISIS 505358 in HepG2.2.15 cells	HepG2 cells with stable HBV (HepG2.2.15)	In vitro	A	No	Ionis	2019N419724_00	4.2.1.1.B
Combination treatment of ISIS 505358 with entecavir and tenofovir in HepG2.2.15 cells	HepG2 cells with stable HBV (HepG2.2.15)	In vitro	A and ETV, A and TDF	No	Ionis	2019N419632_00	4.2.1.2.B
Antiviral effect of bepirovirsen on HBV HBx function in HBV-infected primary human hepatocytes	HBV infected PHH	In vitro	A	No	GSK	2025N565074_00	4.2.1.3.B
In vivo reduction of serum HBV antigens by administration of ISIS 505358 in HBV transgenic mice	HBV-transgenic mice. Mouse (HBV Tg 1.3.32)	In vivo	A	No	The Scripps Research Institute	2019N419019_00	4.2.2.1.B
In vivo dose response evaluation of ISIS 505358 and co-therapy with entecavir in HBV transgenic mice	HBV-transgenic mice. Mouse (HBV Tg 1.3.32)	In vivo	A and ETV	No	Utah State University	2019N418516_00	4.2.2.2.B
HBV binding site analysis for ISIS 505358	NA	In silico	NA	No	Ionis	2015N239571_00	4.2.3.1.B, 4.2.3.2.2.B
Sequence conservation analysis of the bepirovirsen binding site with 9,139 HBV sequences	NA	In silico	NA	No	GSK	2024N561961_00	4.2.3.1.B, 4.2.3.2.1.B, 4.2.3.2.2.B
Studying the anti-HBV activity of bepirovirsen with the HBV RNA launch system	HBV pgRNA transfected HuH7 cells	In vitro	A	No	The Rockefeller University	2021N491812_00	4.2.3.2.1.B
Nonclinical phenotypic evaluation of HBV variants with SNPs in the bepirovirsen binding site.	HBV infected PHH	In vitro	A	No	GSK	2023N540221_01	4.2.1.3.B, 4.2.3.2.2.B

Confidential

All study reports can be found in m5.3.5.4
Key:
A = bepirovirsen (also known as GSK3228836 and ISIS 505358).
NA = not applicable; ETV = Entecavir; TDF = Tenofivir Disproxil Fumarate; HBV = Hepatitis B Virus
PHH = Primary Human Hepatocytes; HBV Tg 1.3.32 = Tg[HBV 1.3 genome]Chi32) (mouse background; C57BL/6) (per Guidotti et al. 1995)

Testing Facility:
GSK = GlaxoSmithKline R&D, US
Ionis = Ionis Pharmaceuticals, Inc. (formally known as ISIS)

表 21 Conversion table for bepirovirsen binding site numbering

Nucleic Acid	Position in bepirovirsen binding site	Position in bepirovirsen binding site relative to the HBV genome[a]	Nucleotide conversion between relative position in binding site and in HBV genome[a]
G	1	1581	G1 = G1581
C	2	1582	C2 = C1582
A	3	1583	A3 = A1583
C	4	1584	C4 = C1584
T	5	1585	T5 = T1585
T	6	1586	T6 = T1586
C	7	1587	C7 = C1587
G	8	1588	G8 = G1588
C	9	1589	C9 = C1589
T	10	1590	T10 = T1590
T	11	1591	T11 = T1591
C	12	1592	C12 = C1592
A	13	1593	A13 = A1593
C	14	1594	C14 = C1594
C	15	1595	C15 = C1595
T	16	1596	T16 = T1596
C	17	1597	C17 = C1597
T	18	1598	T18 = T1598
G	19	1599	G19 = G1599
C	20	1600	C20 = C1600

a. Based on HBV genome Genbank reference genome X02763 numbering starting at the EcoRI restriction site.

Confidential