

## 4. 抗ウイルス薬の個性を知る

### ～ウイルス学と数学の融合研究による C 型肝炎治療薬併用の薬効評価と最適化～

大橋 啓史, 渡士 幸一

国立感染症研究所ウイルス第二部

抗 HCV 治療薬はここ数年、抗ウイルス薬の開発史上類を見ない速さで新薬の上市が進んでおり、その治療成績は著しく改善してきた。一方で、ごく短期間に多くの新薬が開発されたため、個々の薬が持つ性質や特性上の相違点、最適な組み合わせ、薬剤耐性ウイルスに効果を発揮する薬剤の選択、等の深い議論がほとんど行われず、限られた組み合わせの多剤併用療法が用いられてきた。我々はすでに市販されている、もしくは臨床開発段階の抗 HCV 薬 15 種の抗ウイルス活性を培養系で定量し、またこの基礎データを用いた数理モデル解析により、各薬剤の薬効プロファイルを表現するパラメータを導き出した。さらに、コンピュータシミュレーションの援用により現在主流の 2 剤併用療法および今後の導入が想定される 3 剤併用療法での、抗ウイルス効果と耐性変異ウイルスの出現リスクを解析し、多剤併用療法の有用性を定量的に議論した。本稿では、従来のウイルス学に数学を組み合わせた融合研究による抗ウイルス薬の特性解析手法とその応用について解説する。

#### ・序論

唐突ではあるが、読者の方は抗ウイルス薬を開発中のある企業の CEO として次の問いに答えを用意して頂きたい。貴方の会社は競争社会の荒波に飲まれ倒産の危機にある。しかし、研究チームが抗ウイルス剤のシードとなる 2 つの化合物を同定した (A, B と呼称する)。化合物 A はウイルスの複製を 50% に低下させる濃度 ( $IC_{50}$ ) が 10 nM、化合物 B の  $IC_{50}$  は 100 nM であった (図 1)。会社の残りの資金ではどちらか一つの開発を進めることしかできない。貴方は CEO としてどちらの化合物の研究を続けるよう指示を出すか決断して頂きたい。

#### ・抗ウイルス薬の特性

一般に薬剤の活性評価には、ウイルスや細菌など病原体

の産生・複製を 50% 低下させる濃度である  $IC_{50}$  ( $EC_{50}$ )、あるいは 90% 低下濃度の  $IC_{90}$  ( $EC_{90}$ ) が頻用される。 $IC_{50}$  (あるいは  $IC_{90}$ ) が低い薬剤ほどより低濃度でウイルス産生・複製の低下を達成できるため、一般にはできるだけこの値の低い化合物を開発することが開発目標となる。しかし  $IC_{50}$  (あるいは  $IC_{90}$ ) 値だけではその薬剤の特性や薬効の強さ全てを知ることはできない。図 1 からさらに高濃度域にプロットを広げた図 2 を見ていただくと、化合物 A の  $IC_{50}$  は化合物 B よりも 10 倍低い (“優秀”である) にも関わらず、例えば 1000 nM でのウイルス産生阻害率は化合物 A で約 91% なのに対し、化合物 B では約 99% と、抗ウイルス活性が “逆転” していることがわかる。一般に開発された薬剤の多くは、実際の患者体内では  $IC_{50}$  よりもはるかに高い血中濃度になるよう投与されるので、このような高濃度域での抗ウイルス活性が実際には問題となる。さて読者諸氏は、冒頭の設問に対して化合物 A, B のどちらの開発を決断されたらどうか? もし化合物 A の開発を決めたのだとしたら、CEO としての貴方の采配は、そして貴方の会社の将来はいかがなものだろうか、.. ?

以上のような例からも、 $IC_{50}$  値のみからウイルス阻害活性の全てを推定することはできない。この例の場合、図 2 をよく見ればわかるように、主に用量依存曲線の傾きの違いが抗ウイルス活性決定の重要な要因となっている。用量

#### 連絡先

〒 162-8640

東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所ウイルス第二部

TEL: 03-5285-1111

FAX: 03-5285-1161

Email: kwatashi@nih.go.jp

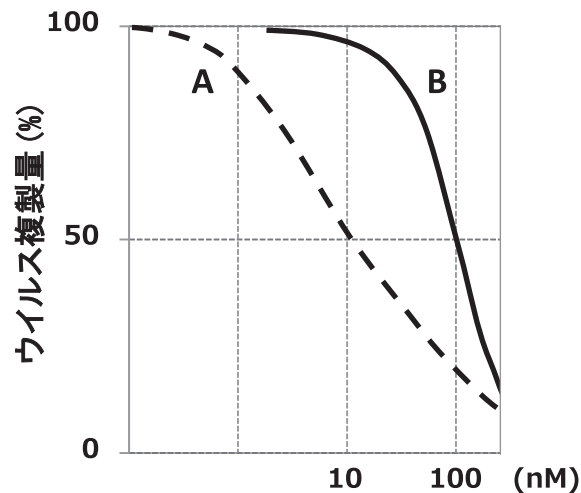


図1 化合物A、Bの抗ウイルス活性(例)  
化合物Aは化合物Bに比較して低いIC<sub>50</sub>を示す。

依存曲線の傾きの指標としては、ヒル係数が知られている。1976年のChouらの論文<sup>1)</sup>において、ヒル係数  $m$  は以下の”Median Effect 方程式”により定義されている。

$$\log\left(\frac{f_a}{f_u}\right) = m \log\left(\frac{D}{IC_{50}}\right).$$

$f_u$ : 阻害されなかったウイルス複製

$f_a$ : 阻害されたウイルス複製 (つまり,  $f_a = 1 - f_u$ )

$m$ : ヒル係数

$D$ : 薬剤投与濃度

図3Aにこの方程式のグラフを示すが、グラフの傾きが  $m$  となる。ここでは例として  $m=1$  と  $m=3$  のグラフを示している(それぞれ薬剤C、Dとする)。そしてさらに同じグラフをプロットの仕方を変えて示したのが図3B、図3Cである。ここで薬剤CとDが全く同じIC<sub>50</sub>をもつとする。このとき例えばIC<sub>50</sub>の10倍濃度投与でのウイルス複製阻害は、 $m=1$ の薬剤Cは約9.1%までであるのに対し、 $m=3$ の薬剤Dは約0.1%である。またウイルス複製が4-log低下するには、薬剤CがIC<sub>50</sub>の9999倍濃度必要であるのに対し、薬剤Dの必要濃度はたったのIC<sub>50</sub>の約22倍である。このように同じIC<sub>50</sub>であるとしても、ヒル係数が異なれば抗ウイルス活性は決定的に異なる。そして重要なこととして、このヒル係数はそれぞれの薬剤に固有の値であり、いわば薬剤の“個性”を示すものである。このような観点を鑑みて我々は、ウイルス学的基礎実験データからそれぞれの薬の個性を明らかにし、また数理的手法を利用することにより抗ウイルス効果の定量解析、また多剤併用<sup>2)</sup>

の最適化と有用性を議論する。その際のモデルケースとして、近年多数の新薬開発が行われている抗C型肝炎ウイルス(HCV)薬<sup>3)</sup>を例に解析した。

#### ・抗HCV薬の系統

現在、標的の異なるさまざまな抗HCV薬が臨床で用いられている。まず、この5年以内に相次いで開発されたのがHCVタンパク質を直接標的とする抗ウイルス薬(direct-acting antivirals; DAAs)であり、NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤(PI)、NS5A阻害剤(NS5AI)、またNS5Bポリメラーゼ阻害剤は核酸型(NI)と非核酸型(NNI)に大別される<sup>4)</sup>。また宿主細胞因子を標的とすることでHCV複製を阻害する宿主標的薬(host-targeting antivirals; HTAs)には、DAA開発以前の標準治療として使用されていたインターフェロン(IFN)と、臨床開発段階のシクロフィリン阻害剤(CI)などが含まれる<sup>4)</sup>。図4AにはこれらHCV治療薬の系統と、本研究で解析した実際の薬剤名を示している。

#### ・なぜ今、C型肝炎治療薬の特性解析なのか？

抗HCV治療薬はここ5年、抗ウイルス薬の開発史上類を見ない新薬開発ラッシュが続いており、治療成績は年々改善している<sup>5-8)</sup>。大変喜ばしいことであるが、その一方あまりに短期間に多くの新薬が開発されたため、これらの薬がどのような性質や特性上の相違点を持っているのか、どのような組み合わせが本来最適であるのか、薬剤耐性ウイルスにどのような治療が効果的か、集団レベルでの疾患克服に今後どのような治療や薬剤開発が望まれるのか、等に関して深い議論をする前に、限られた組み合わせの多剤併用療法が臨床で施行されてきた。しかし今後、抗HCV

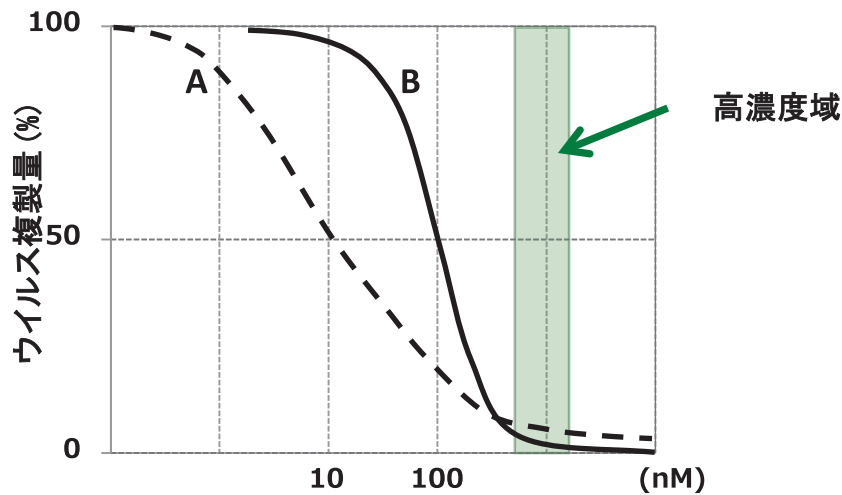


図2 高濃度域での化合物 A, B の抗ウイルス活性 (例)  
高濃度域では化合物 B の方が化合物 A より強い抗ウイルス効果を示す。

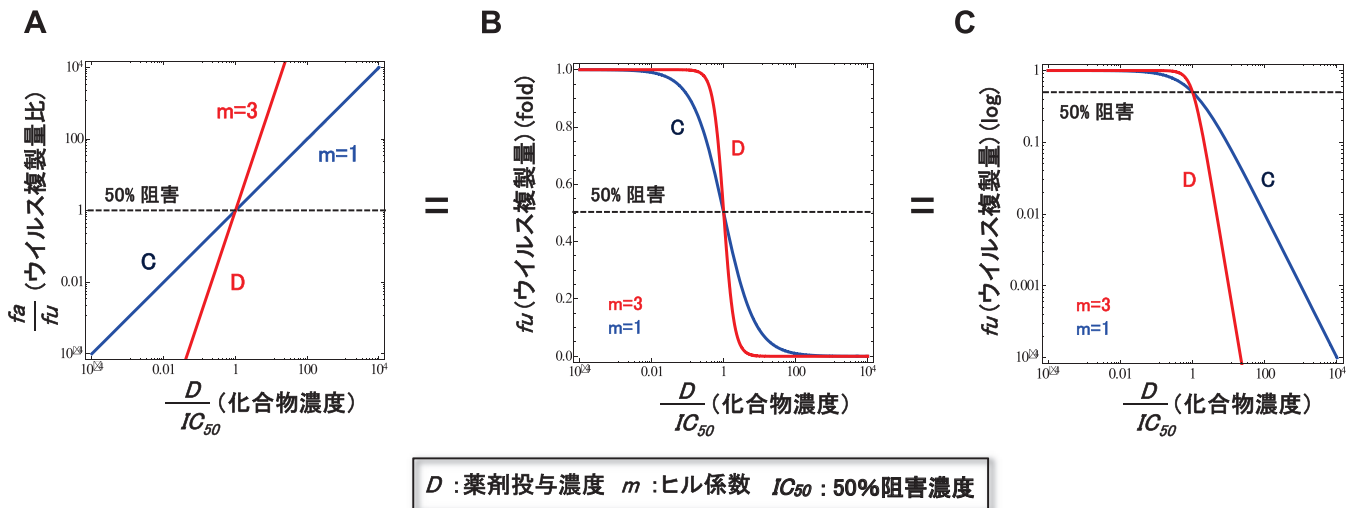


図3 薬剤の用量依存曲線の傾きとヒル係数  
(A)(B)(C)いずれも  $m=1$  の化合物 C と,  $m=3$  の化合物 D の用量依存曲線を示す。

療法により感染者が減少し、難治性多重耐性 HCV<sup>9)</sup> への治療や集団からの HCV 排除が課題となる中で、これらの薬剤が実はどんな性質を持っているのか、抗ウイルス効果を最大化し変異ウイルス出現頻度を最小化する治療の選択、少なくともこれらを解析するための基盤を構築することは大変重要と考えられる。そこで本研究ではさまざまな抗 HCV 薬の薬効プロファイルを解析し、2 剤・3 剤併用の効果や臨床血中濃度における変異ウイルス出現頻度を定量評価することで、最適な併用の組み合わせや多剤併用療法の有用性を議論した。

・ウイルス学的実験データと数理解析による薬効評価

まず本研究では解析対象として、すでに市販されている、あるいは臨床開発段階の抗 HCV 薬を 15 種類ピックアップした (図 4A)。ここには上記に述べた PI, NS5AI, NI, NNI, IFN, CI の 6 つのクラスの薬剤が含まれている。まずこれら薬剤の抗 HCV 効果の基礎的なデータを取得するために、HCV 遺伝子型 1b のルシフェラーゼ含有レプリコン<sup>10)</sup> を HCV 複製評価系として、これにさまざまな濃度の各薬剤を処理した。ルシフェラーゼ活性を指標とする HCV 複製レベルを薬剤濃度に対してプロットし、この濃度依存的ウイルス複製阻害率から  $IC_{50}$  および、前述の Median Effect 方程式よりヒル係数  $m^1$  を求めた (図 4B)。

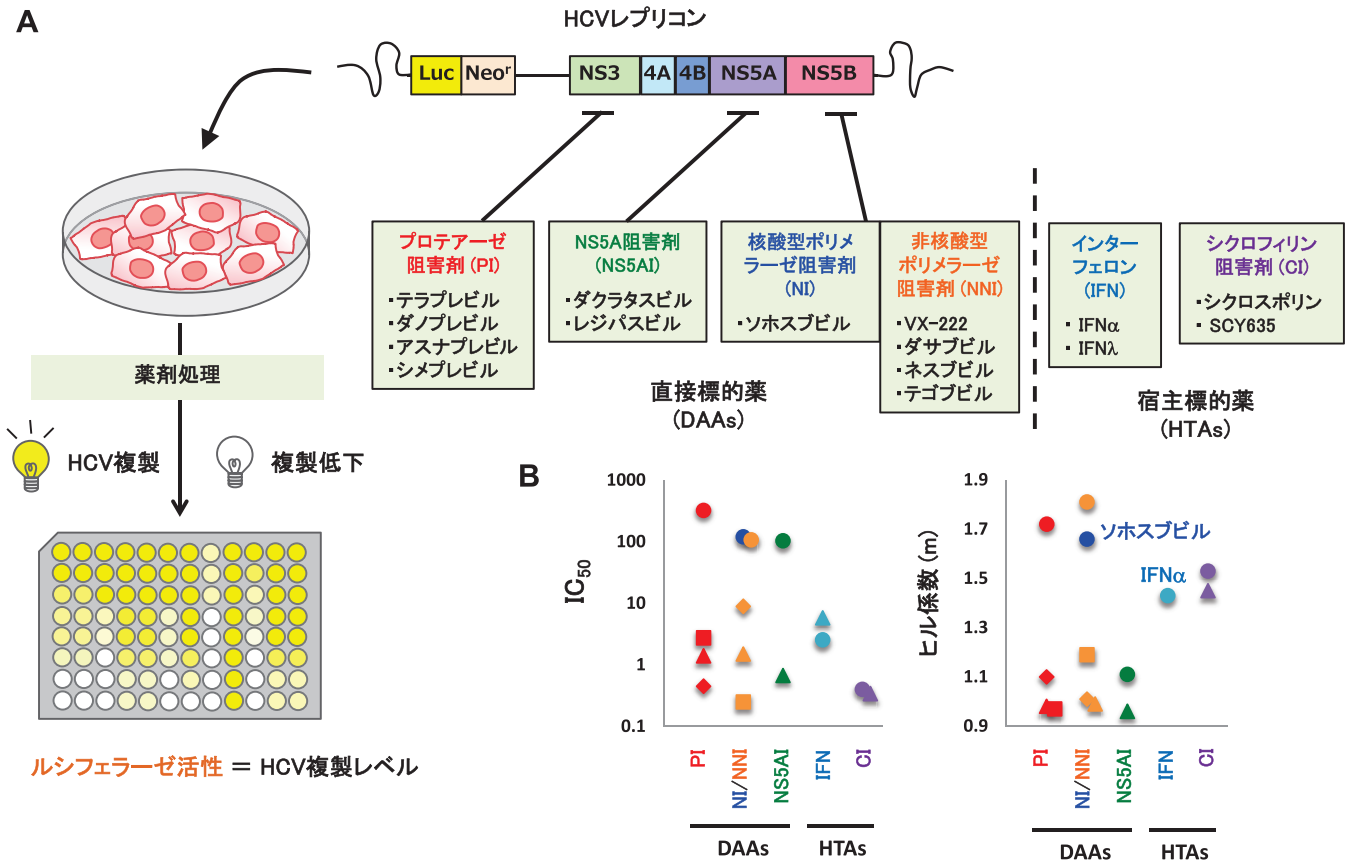


図4 2剤併用でのウイルス複製95%阻害に必要な濃度 (x IC<sub>50</sub>)  
 (A) HCVレプリコンを用いた薬効評価実験と、本研究で評価した抗HCV薬。  
 (B) 各薬剤のIC<sub>50</sub>とヒル係数(m)

IC<sub>50</sub>は各薬剤によりさまざまな値をとり(図4B左), またmに関しては以下のような一定の傾向が認められた(図4B右)。まずDAAのほとんどはm=1前後であった一方で, HTAのmは平均的に1.5前後と比較的高かった(これはIFNもCIも複数種の標的タンパク質を標的として抗HCV効果を発揮するためと推察される)。これらの中で, 理由は明らかではないが, NIソホスブビル<sup>11)</sup>を含むDAA3薬剤に関してはm=1.6~1.9とさらに高いことが明らかとなった。このように各薬剤により抗ウイルス特性が異なっていることが示された。

次に任意薬剤, 任意濃度での薬効を比較評価するために, 抗ウイルス効果の指標としてinstantaneous inhibitory potential (IIP)を導入する。IIPはウイルス複製低下倍率のlog値である(すなわちウイルス複製が1/100, 1/1000になった際のIIPは2および3である)。2008年に抗HIV薬の薬効解析をおこなったShenらの論文<sup>12)</sup>によると, IIPは以下の方程式によって与えられる。

$$IIP = \log\left(\frac{1}{f_u}\right) = \log\left[1 + \left(\frac{D}{IC_{50}}\right)^m\right]$$

f<sub>u</sub>: 阻害されなかったウイルス複製  
 m: ヒル係数  
 D: 薬剤投与濃度

IIP, つまり抗ウイルス効果はIC<sub>50</sub>とmの双方に依存して導かれている。そこでこれを抗HCV薬の薬効解析に導入した。実験データから得られた各抗HCV薬のIC<sub>50</sub>とmから任意濃度の抗ウイルス効果を推定したところ, 例えば95%ウイルス複製阻害を達成するためには, PIアスナプレビル<sup>13)</sup>は20.7倍IC<sub>50</sub>濃度, NS5AIレジパスビル<sup>14)</sup>は21.4倍IC<sub>50</sub>濃度が必要であった。それに対しNIソホスブビルは5.8倍IC<sub>50</sub>濃度で95%阻害を達成できると計算された<sup>15)</sup>。このように, それぞれの抗ウイルス薬の特性の違いが明確になってきた。

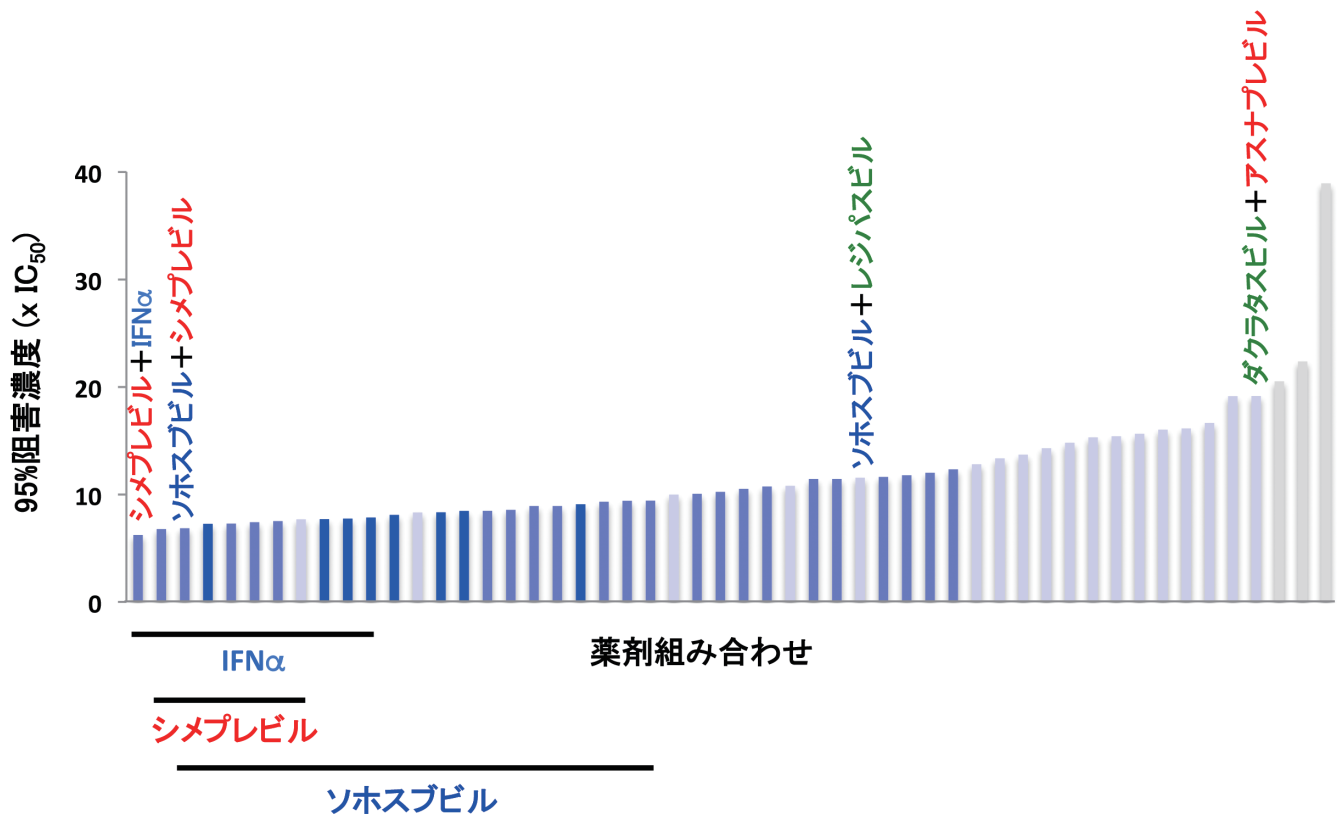


図5 2剤併用でのウイルス複製95%阻害に必要な濃度 (x IC<sub>50</sub>)  
値が低いほど、高濃度での抗ウイルスポテンシャルが高い。

### ・2剤併用の評価

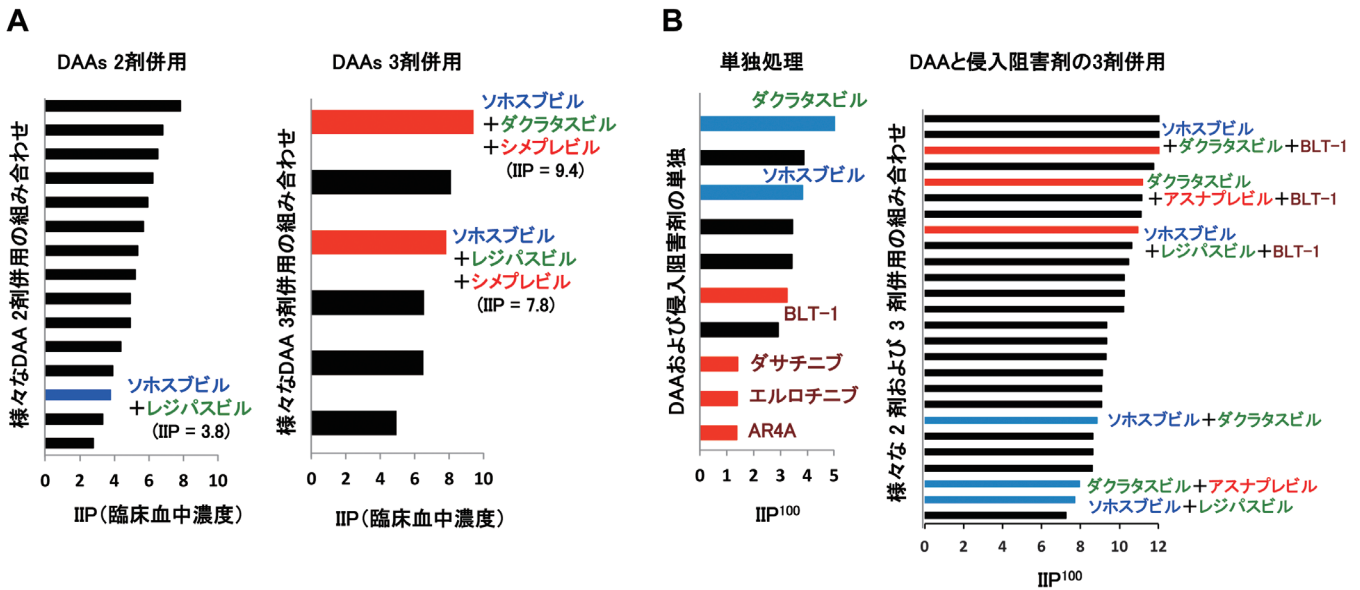
次に2剤併用での効果を解析した。選別した15薬剤間で系統の異なる2剤併用は52種類の組み合わせにのぼるが、この2剤組み合わせを各さまざまな濃度で前述のHCVレプリコンに処理し、その抗ウイルス効果をルシフェラーゼアッセイで定量した。この実験データをもとに各濃度でのIIPを算出し、ここから95%ウイルス複製阻害に必要な濃度を各組み合わせについて計算した(図5)。その結果、95%阻害に必要な薬剤濃度が低い(つまり抗ウイルスポテンシャルの高い)組み合わせにはIFN $\alpha$ 、PIシメプレビル<sup>16)</sup>、NIソホスブビルを含む組み合わせが多く含まれており、特にインターフェロンベース治療として実際に以前用いられていたPIシメプレビル+IFN $\alpha$ <sup>17)</sup>が最も高く、DAAs 2剤併用の中ではNIソホスブビル+PIシメプレビル<sup>18)</sup>が最も高い抗ウイルスポテンシャルを示したものの一つであった。NIソホスブビル+PIシメプレビルの必要濃度は6.8 x IC<sub>50</sub>であり、これは実際に日本で臨床使用されているNIソホスブビル+NS5AIレジパスビル<sup>19)</sup>の11.5 x IC<sub>50</sub>、NS5AIダクラタスビル+PIアスナプレビル<sup>20)</sup>の19.1 x IC<sub>50</sub>よりも明らかに低用量であった。このように多くのDAAsの中で、特にNIソホスブビルは

単独でも2剤併用でも良好な抗ウイルスプロファイルを示し、これは臨床でのこの薬剤の薬効の高さを説明する結果である<sup>6)</sup>。

### ・そして3剤併用へ

現在、DAAs 2剤併用を越えてさらにDAAs 3剤併用<sup>7, 21-23)</sup>での効果が、特に欧米で臨床試験されている。しかしながら、すでに著効率90~95%を越えるDAAs 2剤併用と比べて、DAAs 3剤併用にどれくらい優位性があるかについては、臨床試験の成績のみからは判断が難しい。我々は、想定される3剤の組み合わせ、すなわちソホスブビル+PI(シメプレビルまたはアスナプレビル)に加えてNS5AI(ダクラタスビルまたはレジパスビル)もしくはNNI(ダサブビルまたはVX-222)を併用した際の抗ウイルス効果をこれまでと同様にレプリコンを用いて定量した。またこの解析ではすでに報告されている各薬剤の臨床血中濃度<sup>24, 25)</sup>における各組み合わせのIIPをBlissの組み合わせ理論を用いて計算した(図6A)。臨床濃度でのNIソホスブビル+NS5AIレジパスビルのIIPは3.8であるのに対し、NIソホスブビル+NS5AIレジパスビル+PIシメプレビルのIIPは7.8、つまり抗ウイルス効果はPIシメプレビルを加えることによって約10,000倍上昇する





**図 6 3 剤併用での IIP**  
 値が高いほど抗ウイルスポテンシャルが高い。(A)は各薬剤の臨床血中濃度での IIP、(B)は高濃度 (100 x IC<sub>50</sub>) で各薬剤併用での IIP を示す。

と算出された。また NS5AI としてレジパスビルの代わりにダクラタスビルを用いることによって IIP はさらに 9.4 まで上昇し、これが 3 剤併用で今回調べた中で最も高い抗ウイルス効果を示した。このように 3 剤併用療法の抗ウイルス効果は 2 剤併用よりも明らかに高い。また詳細は省略するが、理論的変異ウイルス出現頻度も計算することができる。NI ソホスブビル + NS5AI レジパスビル 2 剤併用に比較して NI ソホスブビル + NS5AI レジパスビル + PI シメプレビル 3 剤併用の変異ウイルス出現頻度はさらに約 0.0091% に低下する。このように DAA 非奏功例の最大の理由である耐性ウイルス出現<sup>26-31)</sup> は、3 剤併用により劇的に低下できると示唆される。

・侵入阻害剤の特性解析

以上の研究により、それぞれの抗 HCV 薬の特性の違いおよび多剤併用療法の重要性が示唆された。今回構築したフレームワークは理論的にはどのようなウイルス種、ウイルス株、抗ウイルス薬、併用組み合わせにも適用することができると考えられる。上記の解析には全てウイルス RNA 複製過程を阻害する抗 HCV 薬を用いていたが、これら以外にもこれまで吸着・侵入過程や、粒子形成・放出過程を標的とする薬剤<sup>32-34)</sup> も報告されており、多剤併用療法に有用であると期待される。そこで次に我々は侵入阻害剤併用の薬効を、上記と同様に解析した。ここでは HCV 複製に加えて侵入を同時に評価できる感染性 HCV 粒子産生系<sup>35)</sup> を用いた。本系に HCV 遺伝子型 1b 株の検出効率は悪いので遺伝子型 2a (JFH-1 株) を用い、侵入阻害剤を

様々な濃度で処理した際の侵入 HCV RNA を定量し、抗ウイルス効果の基礎データを取得した。侵入阻害剤としては、標的の異なる 3 系統の薬剤として HCV E2 抗体 (AR4A)<sup>36)</sup>、EGFR/EphA2 阻害剤 (ダサチニブ、エルロチニブ)<sup>37)</sup>、SR-BI 阻害剤 (BLT-1)<sup>38)</sup> を用いた。実験で得られた用量依存曲線からの単剤薬効解析では、このうち SR-BI 阻害剤 BLT-1 が高濃度域での IIP が最も高く、その値は DAAs と概ね同程度であった (図 6B)。また DAAs 2 剤と組み合わせた 3 剤併用の IIP は、組み合わせる侵入阻害剤の種類に大きく依存しており、特に NI ソホスブビル + NS5AI ダクラタスビル + BLT-1 はほとんどの DAAs 3 剤併用に比較しても高い薬効を示すと推定された。すなわち薬剤ごとに大きな差はあるものの、組み合わせによって侵入阻害剤は DAA 併用の薬効を大きく上昇させると示唆された<sup>39)</sup>。特に BLT-1 のような HTA は薬剤耐性ウイルスの出現頻度も低いと期待される。

以上のように本研究では、ウイルス学的実験データと数理解析を組み合わせることさまざまな抗ウイルス剤の持つ特性を解析・評価するプラットフォームを構築した。

・今後の展開

今回の研究では薬剤耐性変異を持たない HCV を用いて各薬剤の薬効を調べた。今後臨床では、DAAs に薬剤耐性を獲得したウイルスをどのように治療するかが主課題となる。そこで薬剤耐性変異を持つ HCV レプリコンを用いて各薬剤の抗 HCV 効果を今回と同様に解析することで、どのような併用療法が薬剤耐性ウイルスの排除に有効である

かを提示することが可能である。また今回解析した遺伝子型1や2だけでなく、全世界には南アジアおよびオセアニアで流行する遺伝子型3やアフリカ中央・北東部とイスラム半島で見られる遺伝子型4などさまざまなHCV遺伝子型が存在し<sup>40)</sup>、一般に薬剤感受性も異なると考えられる。そのため、既存の抗HCV薬の有効性がこれらHCV遺伝子型の違いによってどの程度異なるかも重要な課題の一つである。いずれにも今回構築した解析系が有効であると考えられ、これによって各薬剤の個性が明らかとなり、得られる結果は世界的なHCV排除に有用な情報を与えるものと期待される。

#### ・まとめ

以上、ウイルス培養系での薬剤感受性実験のみでは見えてこない薬剤の特性を、数理解析を利用して評価した。これまであまり鑑みられてこなかった抗ウイルス薬の持つ様々な特性、それぞれの薬の“個性”ともいべきものが浮かび上がり、抗ウイルス薬の多様性が明らかとなった。本稿では、特に数学的な説明はほとんど省略し概略しか述べなかったが、より詳細を知りたい方は原著論文<sup>15)</sup>および<sup>39)</sup>を参照いただければ幸いである。

#### ・謝辞

本研究ではさまざまな方にご協力をいただきました。著者は主にウイルス学を専門にする研究者ですが、特に本研究の数理解析には金沢大学 小泉吉輝先生、九州大学大学院理学研究院 岩見真吾先生に多大な貢献をいただきました。ここに特に深謝いたします。

本稿に関連する、著者の開示すべき利益相反はありません。

#### ・参考文献

- 1) Chou TC. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands. *J Theor Biol* 1976;59:253-276.
- 2) Schinazi R, Halfon P, Marcellin P, Asselah T. HCV direct-acting antiviral agents: the best interferon-free combinations. *Liver Int* 2014;34 Suppl 1:69-78.
- 3) Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology* 2014;146:1176-1192.
- 4) Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:482-496.
- 5) Pawlotsky JM. Hepatitis C treatment: the data flood goes on-an update from the liver meeting 2014. *Gastroenterology* 2015;148:468-479.
- 6) Pawlotsky JM, Feld JJ, Zeuzem S, Hoofnagle JH. From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *J Hepatol* 2015;62:S87-99.
- 7) Kohli A, Osinusi A, Sims Z, Nelson A, Meissner EG, Barrett LL, Bon D, et al. Virological response after 6 week triple-drug regimens for hepatitis C: a proof-of-concept phase 2A cohort study. *Lancet* 2015;385:1107-1113.
- 8) Lau G, Benhamou Y, Chen G, Li J, Shao Q, Ji D, Li F, et al. Efficacy and safety of 3-week response-guided triple direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C infection: a phase 2, open-label, proof-of-concept study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2016;1:97-104.
- 9) Takeda H, Ueda Y, Inuzuka T, Yamashita Y, Osaki Y, Nasu A, Umeda M, et al. Evolution of multi-drug resistant HCV clones from pre-existing resistant-associated variants during direct-acting antiviral therapy determined by third-generation sequencing. *Sci Rep* 2017;7:45605.
- 10) Goto K, Watashi K, Murata T, Hishiki T, Hijikata M, Shimotohno K. Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:879-884.
- 11) Sofia MJ, Bao D, Chang W, Du J, Nagarathnam D, Rachakonda S, Reddy PG, et al. Discovery of a beta-d-2'-deoxy-2'-alpha-fluoro-2'-beta-C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J Med Chem* 2010;53:7202-7218.
- 12) Shen L, Peterson S, Sedaghat AR, McMahon MA, Callender M, Zhang H, Zhou Y, et al. Dose-response curve slope sets class-specific limits on inhibitory potential of anti-HIV drugs. *Nat Med* 2008;14:762-766.
- 13) Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, Martorell C, Everson GT, Ghalib R, Reindollar R, et al. Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N Engl J Med* 2012;366:216-224.
- 14) Lawitz EJ, Gruener D, Hill JM, Marbury T, Moorehead L, Mathias A, Cheng G, et al. A phase 1, randomized, placebo-controlled, 3-day, dose-ranging study of GS-5885, an NS5A inhibitor, in patients with genotype 1 hepatitis C. *J Hepatol* 2012;57:24-31.
- 15) Koizumi Y, Ohashi H, Nakajima S, Tanaka Y, Wakita T, Perelson AS, Iwami S, et al. Quantifying antiviral activity optimizes drug combinations against hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:1922-1927.
- 16) Raboisson P, de Kock H, Rosenquist A, Nilsson M, Salvador-Oden L, Lin TI, Roue N, et al. Structure-activity relationship study on a novel series of cyclopentane-containing macrocyclic inhibitors of the hepatitis C virus NS3/4A protease leading to the discovery of TMC435350. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:4853-4858.
- 17) Manns M, Marcellin P, Poordad F, de Araujo ES, Buti M, Horsmans Y, Janczewska E, et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a or 2b plus ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-2) : a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2014;384:414-426.

- 18) Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, Rodriguez-Torres M, Younossi ZM, Corregidor A, DeJesus E, et al. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: the COSMOS randomised study. *Lancet* 2014;384:1756-1765.
- 19) Afdhal N, Reddy KR, Nelson DR, Lawitz E, Gordon SC, Schiff E, Nahass R, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2014;370:1483-1493.
- 20) Chayama K, Takahashi S, Toyota J, Karino Y, Ikeda K, Ishikawa H, Watanabe H, et al. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *Hepatology* 2012;55:742-748.
- 21) Everson GT, Sims KD, Rodriguez-Torres M, Hezode C, Lawitz E, Bourliere M, Loustaud-Ratti V, et al. Efficacy of an interferon- and ribavirin-free regimen of daclatasvir, asunaprevir, and BMS-791325 in treatment-naïve patients with HCV genotype 1 infection. *Gastroenterology* 2014;146:420-429.
- 22) Poordad F, Sievert W, Mollison L, Bennett M, Tse E, Brau N, Levin J, et al. Fixed-dose combination therapy with daclatasvir, asunaprevir, and beclabuvir for non-cirrhotic patients with HCV genotype 1 infection. *JAMA* 2015;313:1728-1735.
- 23) Muir AJ, Poordad F, Lalezari J, Everson G, Dore GJ, Herring R, Sheikh A, et al. Daclatasvir in combination with asunaprevir and beclabuvir for hepatitis C virus genotype 1 infection with compensated cirrhosis. *JAMA* 2015;313:1736-1744.
- 24) Lalezari J, Sullivan JG, Varunok P, Galen E, Kowdley KV, Rustgi V, Aguilar H, et al. Ombitasvir/paritaprevir/r and dasabuvir plus ribavirin in HCV genotype 1-infected patients on methadone or buprenorphine. *J Hepatol* 2015;63:364-369.
- 25) Friborg J, Zhou N, Han Z, Yang X, Falk P, Mendez P, McPhee F. In Vitro Assessment of Re-treatment Options for Patients with Hepatitis C Virus Genotype 1b Infection Resistant to Daclatasvir Plus Asunaprevir. *Infect Dis Ther* 2014.
- 26) Zoulim F, Liang TJ, Gerbes AL, Aghemo A, Deuffic-Burban S, Dusheiko G, Fried MW, et al. Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. *Gut* 2015;64:1824-1833.
- 27) Sarrazin C, Lathouwers E, Peeters M, Daems B, Buelens A, Witek J, Wyckmans Y, et al. Prevalence of the hepatitis C virus NS3 polymorphism Q80K in genotype 1 patients in the European region. *Antiviral Res* 2015;116:10-16.
- 28) Jacobson IM, Dore GJ, Foster GR, Fried MW, Radu M, Rafalsky VV, Moroz L, et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1) : a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2014;384:403-413.
- 29) Fornis X, Lawitz E, Zeuzem S, Gane E, Bronowicki JP, Andreone P, Horban A, et al. Simeprevir with peginterferon and ribavirin leads to high rates of SVR in patients with HCV genotype 1 who relapsed after previous therapy: a phase 3 trial. *Gastroenterology* 2014;146:1669-1679 e1663.
- 30) McPhee F, Suzuki Y, Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, Yu ML, et al. High Sustained Virologic Response to Daclatasvir Plus Asunaprevir in Elderly and Cirrhotic Patients with Hepatitis C Virus Genotype 1b Without Baseline NS5A Polymorphisms. *Adv Ther* 2015;32:637-649.
- 31) Yoshimi S, Imamura M, Murakami E, Hiraga N, Tsuge M, Kawakami Y, Aikata H, et al. Long term persistence of NS5A inhibitor-resistant hepatitis C virus in patients who failed daclatasvir and asunaprevir therapy. *J Med Virol* 2015;87:1913-1920.
- 32) Qian XJ, Zhu YZ, Zhao P, Qi ZT. Entry inhibitors: New advances in HCV treatment. *Emerg Microbes Infect* 2016;5:e3.
- 33) Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, Baumert TF. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol* 2011;54:566-576.
- 34) Zeisel MB, Lupberger J, Fofana I, Baumert TF. Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C - perspectives and challenges. *J Hepatol* 2013;58:375-384.
- 35) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-796.
- 36) Giang E, Dorner M, Prentoe JC, Dreux M, Evans MJ, Bukh J, Rice CM, et al. Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:6205-6210.
- 37) Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011;17:589-595.
- 38) Rodrigues CD, Hannus M, Prudencio M, Martin C, Goncalves LA, Portugal S, Epiphany S, et al. Host scavenger receptor SR-BI plays a dual role in the establishment of malaria parasite liver infection. *Cell Host Microbe* 2008;4:271-282.
- 39) Ohashi H, Koizumi Y, Fukano K, Wakita T, Perelson AS, Iwami S, Watashi K. Reply to Padmanabhan and Dixit: Hepatitis C virus entry inhibitors for optimally boosting direct-acting antiviral-based treatments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E4527-E4529.
- 40) Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2015;61:77-87.



# **Revealing the characteristics of antiviral agents**

## **~Evaluation and optimization of anti-hepatitis C virus agents with a mathematical method based on experimental data on virology~**

**Hirofumi OHASHI, Koichi WATASHI**

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Japan

Rapid development of novel anti-hepatitis C virus (HCV) agents in recent years has greatly improved treatment outcomes. However, such rapid progress in anti-HCV treatment has not allowed us to fully argue the different characteristics of each anti-HCV agent, optimal multidrug combinations, and the selection of treatment enabling to efficiently eliminate drug resistant viruses. We here quantified the intrinsic antiviral effect of 15 anti-HCV agents either clinically available or under developmental phase using a cell culture system, and identified the parameters that represent the antiviral profile of drugs through mathematical analysis. A computer simulation that calculated the antiviral activity and the frequency of mutation rate under dual- and triple-multidrug treatment presented the argument for the advantage of multidrug treatments. In this review, we summarize the novel approaches to evaluate intrinsic antiviral efficacy of drugs by combining the virological and mathematical analyses.

