ベムリディ錠 25 mg

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.4　非臨床試験の概括評価

ギリアド・サイエンシズ株式会社

(0000)

目次

1　非臨床試験の概括評価 9
1.1　非臨床試験計画概略 10
2　薬理試験 11
2.1　効力を裏付ける試験 11
2.2　副次的薬理試験 12
2.3　安全性薬理試験 13
2.4　薬力学的薬物相互作用 13
3　薬物動態 14
3.1　分析法 14
3.2　吸収（*In vitro* 試験及び単回投与試験） 14
3.3　反復投与 15
3.4　分布 15
3.4.1　組織内分布 15
3.4.2　タンパク結合 15
3.4.3　胎盤通過 16
3.4.4　乳汁移行 16
3.5　代謝 16
3.5.1　細胞内代謝 16
3.5.2　推定代謝経路 17
3.5.3　*In vitro* 代謝 19
3.5.4　*In vivo* 代謝 19
3.6　排泄 19
3.6.1　尿、糞及び胆汁中排泄 19
3.7　薬物動態学的薬物相互作用 20
3.7.1　CYP 阻害 20
3.7.2　UGT1A1 阻害 21

3.7.3　肝酵素誘導作用 21
3.7.4　TAF の代謝 21
3.7.5　トランスポーターを介した薬物相互作用 22
3.8　薬物動態のまとめ 25
4　毒性試験 26
4.1　単回投与毒性 26
4.2　反復投与毒性 26
4.2.1　腎臓 27
4.2.2　骨 27
4.2.3　その他 27
4.3　遺伝毒性 28
4.4　がん原性 28
4.5　生殖発生毒性 29
4.6　新生児に対する毒性 30
4.7　局所刺激性 30
4.8　その他の毒性試験 30
4.8.1　抗原性 30
4.8.2　免疫毒性 30
4.8.3　代謝物 31
4.8.4　不純物／分解生成物 31
4.8.5　光毒性評価 31
4.9　毒性の要約及び標的臓器 31
4.9.1　標的臓器 31
4.9.2　曝露量比 33
5　総括及び結論 34
6　参考文献 37

表目次

表 2.4-1.　ヒトにおける TAF 経口投与後の定常状態での TAF 及び TFV の 薬物動態パラメーター 20

表 2.4-2.　TAF 及び TFV の各トランスポーターに対する阻害作用及び基質となる可能性の検討結果 23

表 2.4-3.　各種動物での無毒性量（NOAEL）と比較したときの TAF 及び TFV の AUC_{ss} に基づく安全域 34

図目次

図 2.4- 1　TAF の細胞内活性化経路 17

図 2.4- 2　TAF の推定代謝経路 18

略号及び用語の説明

略号	日本語	英語
AhR	芳香族炭化水素受容体	aryl hydrocarbon receptor (AHR gene product)
AUC	濃度－時間曲線下面積	area under the concentration versus time curve
AUC_{0-t}	0 時間から t 時間までの濃度－時間曲線下面積	partial area under concentration versus time curve from time “0” to “t” (default units are hours)
AUC_{ss}	定常状態における濃度－時間曲線下面積	area under the concentration versus time curve at steady state
f.b.e.	遊離塩基換算	free base equivalents
BCRP	乳癌耐性蛋白	breast cancer resistance protein (ABCG2)
BDC	胆管カニューレ挿入	bile-duct cannulated
BMD	骨密度	bone mineral density
BNPP	ビス p-ニトロフェニルフォスフェート	bis p-nitrophenyl phosphate
BSEP	-	bile salt excretory pump
Caco-2	ヒト結腸癌由来の細胞株	human colon carcinoma cell line
CatA	カテプシン A	cathepsin A
CES1	カルボキシルエステラーゼ 1	carboxylesterase 1
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	Chinese Hamster Ovary
C_{max}	最高濃度	maximum observed concentration
COBI	コビシスタット	cobicistat (GS-9350)
COX	シトクロム c オキシダーゼ	cytochrome c oxidase
CsA	シクロスポリン A	cyclosporine A
CYP	シトクロム P450	cytochrome P450
dATP	デオキシアデノシン三リン酸	deoxyadenosine triphosphate
DMSO	ジメチルスルホキシド	dimethyl sulfoxide
DNA	デオキシリボ核酸	deoxyribonucleic acid
DXA	-	dual-emission X-ray absorptiometry
EC_{50}	50%効果濃度	half maximal effective concentration or concentration of compound inhibiting virus replication by 50%
ECG	心電図	electrocardiograph, electrocardiogram
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
GMP	製造管理及び品質管理に関する基準	Good Manufacturing Practice
GS-7171	TAF のラセミ混合物	racemic mixture of TAF, GS-7340
GS-7339	TAF のジアステレオマーB	diastereomer B of TAF, GS-7340

略号及び用語の説明（続き）

略号	日本語	英語
HBV	B 型肝炎ウイルス	hepatitis B virus
HCV	C 型肝炎ウイルス	hepatitis C virus
HEPES	-	4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子	human ether-à-go-go related gene
HIV-1	ヒト免疫不全ウイルス 1 型	human immunodeficiency virus type 1
HPMC	ヒドロキシプロピルメチルセルロース	hydroxypropylmethylcellulose
IC_{50}	50%阻害濃度	concentration resulting in 50% of maximum inhibition
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議	International Conference on Harmonization (of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
INSTI	インテグラーゼ阻害剤	integrase strand transfer inhibitor
LE	-	Long Evans
mRNA	メッセンジャーリボ核酸	messenger ribonucleic acid
MATE	-	multidrug and toxin extrusion protein
MRP1, 2, or 4	多剤耐性関連蛋白質	multidrug resistance related protein 1, 2, or 4
mtDNA	ミトコンドリア DNA	mitochondrial DNA
NOAEL	無毒性量	no-observed-adverse-effect level
NNRTI	非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤	nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor
NRTI	ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤	nucleoside reverse transcriptase inhibitor
NtRTI	ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤	nucleotide reverse transcriptase inhibitor
OAT1	有機アニオントランスポーター1	organic anion transporter 1 (SLC22A6)
OAT3	有機アニオントランスポーター3	organic anion transporter 3 (SLC22A8)
OATP1B1	-	organic anion transporting polypeptide 1B1 (SLCO1B1)
OATP1B3	-	organic anion transporting polypeptide 1B3 (SLCO1B3)
OCT1	-	organic cation transporter 1
OCT2	-	organic cation transporter 2 (SLC22A2)
PBMC	末梢血単核球	peripheral blood mononuclear cell
P-gp	P 糖蛋白質	permeability glycoprotein

略号及び用語の説明（続き）

略号	日本語	英語
PI	プロテアーゼ阻害剤	protease inhibitor
PR	心電図の心房脱分極を表すP波の初めから、心室の再分極を表すT波の終了までの間隔	electrocardiographic interval occurring between the beginning of the P wave and the QRS complex representing the time for atrial and ventricular depolarization, respectively
PXR	プレグナンX受容体	pregnane X receptor
QT	心電図の心室脱分極を表すQ波の初めから、心室再分極を表すT波の終了までの間隔	electrocardiographic interval between the beginning of the Q wave and termination of the T wave representing the time for both ventricular depolarization and repolarization to occur
RPTECs	腎近位尿細管上皮細胞	renal proximal tubule epithelial cells
RT	逆転写酵素	reverse transcriptase
SIV	サル免疫不全ウイルス	simian immunodeficiency virus
SD	-	Sprague-Dawley
$t_{1/2}$	消失半減期	half-life
T3	トリヨードサイロニン	triiodothyronine
TAF	テノホビル アラフェナミド、GS-7340	tenofovir alafenamide (GS-7340)
TDF	テノホビル ジソプロキシルフマル酸塩	tenofovir disoproxil fumarate
TFV	テノホビル	tenofovir
TFV-DP	テノホビル二リン酸	tenofovir diphosphate
TFV-MP	テノホビル一リン酸	tenofovir monophosphate
TK	トキシコキネティクス	toxicokinetics
t_{max}	最高濃度到達時間	time (observed time point) of C_{max}
WHV	ウッドチャック肝炎ウイルス	woodchuck hepatitis virus

1　非臨床試験の概括評価

本資料は、B 型慢性肝炎の治療におけるテノホビル アラフェナミド（TAF、開発コード：GS-7340）錠の医薬品販売承認申請をサポートするために提出する。原薬は TAF フマル酸塩であり、非臨床試験の要約ではフマル酸塩で得られた結果を記載する。TAF はヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤（NtRTI）であるテノホビル（TFV）のホスホンアミデートプロドラッグである。TFV は、B 型肝炎ウイルス（HBV）逆転写酵素（RT）及びヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）RT を阻害する。TFV の膜透過性及び経口バイオアベイラビリティは低い。テノホビル ジソプロキシルフマル酸塩（TDF）は、B 型慢性肝炎の治療を適応とする既承認の TFV のプロドラッグである（販売名：テノゼット®錠 300mg）。

TAFは標的細胞で速やかにTFVに加水分解された後、リン酸化されて活性代謝物であるテノホビル二リン酸（TFV-DP）に代謝される。TFV-DPはHBV RT及びHIV-1 RTを阻害し、逆転写過程でデオキシアデノシン三リン酸（dATP）の取り込みを競合的に阻害してウイルスのデオキシリボ核酸（DNA）鎖の伸長を停止させる［1、2］。TAFはヒト血漿中でTDFよりも安定であるため、TDFの約 1/10 の投与量でも細胞内TFV-DP濃度は高く、循環血中TFV濃度は約 90%低い［3、4］（2.7.2.2.3.1.1 項）。このTAF特有の代謝メカニズムにより、TDFと比較して優れた臨床プロファイルを示す可能性がある。

TAFと典型的な代謝酵素との相互作用は少なく、ヒト初代肝細胞では主にカルボキシルエステラーゼ 1（CES1）で加水分解される［4、5］。また、TAFは*in vitro*で受動輸送及び寄与は少ないが肝取込みトランスポーターであるorganic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 並びに OATP1B3 により効率的に肝細胞に取り込まれる［5］。このTAFの効率的な肝取り込み及び肝細胞内代謝によって、ヒト初代肝細胞でのTFV-DP細胞内濃度は、TFV及びTDF添加時と比較してそれぞれ約 120 倍及び約 5 倍上昇した［5］。

このように、TAFは肝臓へのTFVの送達を増加させる。活性代謝物を効率的に送達させるというB型慢性肝炎治療を目的としたTAFの開発コンセプトは、イヌ試験でTAF経口投与後の初回通過効果における肝抽出率が投与量の約 65%と高く、高濃度のTFV-DPが肝臓で観察されたことからも裏付けられる［5、6］。

TAFはTFVと異なり、腎有機アニオントランスポーター（OAT）1 及びOAT3 と相互作用せず、基質としても働かない。TAFはこれらのトランスポーターを一過性に発現させたヒト腎上皮細胞においてOAT依存性細胞毒性を示さない。したがって、TAFが能動的（OAT依存的）に腎近位尿細管に蓄積する可能性は低い。TAFが腎尿細管細胞へのTFV負荷に寄与するとは考え難く、腎細胞中TFV濃度は血漿中TFV濃度に相関すると考えられる。TAF 25 mg投与後のTFV濃度はTDF投与後（300 mg）に比べて約 90%低い。TFVの全身曝露量の低値及びTFV-DPの細胞内濃度の高値がTDF投与後のリスクとして知られる腎毒性及び骨密度低下を低減させると考えられる［7、8］（2.7.4.2.1.5 項）。

本項で示した非臨床データは、B 型慢性肝炎治療に対する TAF の使用を推奨するものであり、TAF の良好なベネフィット・リスクプロファイルを裏付けるものである。

1.1　非臨床試験計画概略

本資料では、TAF の評価に関連する非臨床情報の概要を提供する。

TAF の承認申請をサポートするために包括的な非臨床薬理／ウイルス学、薬物動態及び毒性試験プログラムを実施した。主要な安全性薬理試験、毒性試験及びトキシコキネティクス（TK）試験は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）が発行するガイドライン、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）、又はその他の適用可能な国際的な保健当局により公布された規制に従って実施した。予備試験及び探索的試験は、GLP を遵守した試験施設で実施するか、又は適切な試験計画書及び文書に従って実施することでデータの完全性を確保した。

TAF の薬理学的活性を評価するため、TAF（及び TFV）を用いた効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験を実施した。TAF は *in vitro* 及び *in vivo* において標的細胞内に効率的に取り込まれ、強力かつ選択的な抗 HBV 活性を示した。また、TFV-DP はほ乳類 DNA ポリメラーゼ α、β、δ、ε 及びミトコンドリア DNA（mtDNA）ポリメラーゼ γ に対して非常に弱い阻害作用しか示さず、TDF 及び TFV はいずれもリガンドの宿主タンパク質への結合に対して阻害又は活性化作用を示さなかった。安全性薬理試験では TAF の投与による影響はほとんどみられなかった。

マウス、ラット、イヌ、ウサギ及びサルで TAF の吸収、分布、代謝及び排泄を評価した。また、*in vitro* 試験で TAF の吸収、代謝及び薬物動態学的薬物相互作用を評価した。TAF は、CES1 及びカテプシン A（CatA）を含む細胞内酵素により代謝され、典型的な薬物代謝酵素との相互作用は少ない。TAF は TDF と異なりヒト血漿中において比較的安定である［消失半減期（$t_{1/2}$）：*in vitro* 試験で約 75 分（2.6.4.5.1.1 項）、臨床試験で約 0.48 時間（中央値、2.7.2.3.2.1 項）］。TAF は、TDF より血漿中で安定であるため高い細胞内濃度が得られ、TFV の細胞内送達は増加し、TAF 投与後の循環血中 TFV 濃度は TDF 投与後より約 90%低い［3、4］。これらの所見は、TDF 投与後のリスクである腎毒性及び骨密度低下を減弱させると考えられる［7、8］（2.7.4.2.1.5 項）。

TAF の吸収は良好であり、毒性評価のために選択した動物種において十分な曝露が得られた。TAF はマウス、ラット、イヌ及びサルの 39 週間までの反復投与毒性試験で評価された。*In vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験を実施した。マウスは *in vivo* の遺伝毒性試験及び局所リンパ節試験で使用した。ラットは受胎能試験及び胚・胎児発生試験で、ウサギは胚・胎児発生試験及び局所刺激性試験で用いた。感作性試験及び皮膚刺激性試験を除く全ての *in vivo* 試験は、臨床投与経路である経口投与で実施した。ラット及びイヌの *in vitro* 及び *in vivo* 代謝プロファイルは、ヒトと類似していることが示されている。毒性試験の溶媒には、1）25 mmol/L クエン酸、2）0.5%ポリソルベート 20、0.5%カルボキシメチルセルロース、0.9%ベンジルアルコール、又は 3）0.1% (v/v) ポリソルベート 20 及び 0.1% (v/v) ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）を使用した。

TAF を用いたがん原性試験及び出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験は実施していない。これらの試験は、同じ TFV のプロドラッグである TDF を用いて実施されている。TAF 投与後の TFV 曝露量は、TDF 投与後の TFV 曝露量より低値であることから、TDF の試験成績で TAF のがん原性及び出生前及び出生後の発生の評価が可能である。

毒性試験では、B 型慢性肝炎患者における TAF の推奨臨床用量での TFV 曝露量に対し、それぞれ 12 倍、4 倍及び 18 倍超の曝露量を示すラットでの 26 週間までの投与、イヌでの 39 週間までの投与及びサルでの 4 週間投与で毒性所見はみられなかった。

2　薬理試験

TAF の薬理学的活性を評価するため、TAF（及び TFV）を用いた効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験を実施した。

2.1　効力を裏付ける試験

標的細胞においてTAFはTFVに速やかに加水分解され、続いて活性代謝物であるTFV-DPへとリン酸化される［9、10］。TFV-DPはHBV RT及びHIV-1 RTのヌクレオチド阻害剤であり、逆転写過程でデオキシアデノシン三リン酸（dATP）の取り込みを競合的に阻害して、ウイルスのDNA鎖の伸長を停止させる［2、11］。

TAF は *in vitro* で受動輸送及び寄与は少ないが、肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 並びに OATP1B3 により、効率的に肝細胞に取り込まれることが示された（試験番号 AD-120-2022；2.6.2.2.1.1 項）。HBV の標的であるヒト初代肝細胞で、TAF は主に CES1 によって TFV へと加水分解され、CatA の寄与は小さかった（試験番号 AD-120-2031；2.6.2.2.1.2.1 項）。一方、HIV-1 の標的であるヒト初代リンパ球系細胞において、TAF は主に CatA によって TFV へと加水分解される（2.6.2.2.1.2.3 項）。TAF の効率的な取り込みと細胞内代謝により、ヒト初代肝細胞での細胞内 TFV-DP 濃度は、TFV 及び TDF 添加時と比較してそれぞれ約 120 倍及び約 5 倍高かった（試験番号 AD-120-2017；2.6.2.2.1.3.1 項）。

アカゲザルでの TAF（モノフマル酸塩）50 mg/kg 単回経口投与後の血漿中 TAF 及び TFV 濃度は、それぞれ最高濃度到達時間（t_{max}）0.5 及び 1 時間で速やかに上昇した。末梢血単核球（PBMC）での TFV 濃度は 96 時間まで維持され、明らかに血漿中より消失が遅かった（試験番号 P2000087；2.6.2.2.1.4.1 項）。ビーグル犬に TAF（モノフマル酸塩）10 mg/kg を単回経口投与した後、TAF は速やかに吸収され、血漿中 TAF の t_{max} は 0.08 時間であり、その後 0.24 時間の $t_{1/2}$ で速やかに消失した。血漿中の主な代謝物は TFV であり、最高濃度（C_{max}）は 2.23 µmol/L であった。肝臓中の主な代謝物は TFV-DP であり、投与 4.0 時間後で C_{max} 126 µmol/L に達した（試験番号 AD-120-2034；2.6.2.2.1.4.2 項）。

HepG2 細胞（肝細胞株）において、TAF は野生型ジェノタイプ A～H の HBV 臨床分離株に対して同程度の抗 HBV 活性を示し、その平均 50%効果濃度（EC_{50}）は 86.6 nmol/L であった（試験番号 PC-320-2003；2.6.2.2.2.1 項）。TAF は、検討した最高濃度（44400 nmol/L）まで細胞傷害性を示さず、HepG2 細胞での抗 HBV 活性に対する選択性は 513 倍超であった（試験番号 PC-320-2003 及び PC-120-2007；2.6.2.2.4.1 項）。短期（4 週間）及び長期（48 週間）*in vivo* 抗 HBV 作用試験において、ウッドチャック肝炎ウイルス（WHV）感染ウッドチャックに TDF を経口投与したところ、WHV に対する TDF の抗ウイルス活性が示された（試験番号 PC-174-2004；2.6.2.2.3.1 項）。

持続的に HBV が増殖する確立した組織培養アッセイ系がないため、TAF に対する *in vitro* 耐性発現試験は実施していない。しかし、TAF に対する感受性にわずかな低下が認められた二重耐性変異体（rtA181V + rtN236T）を除いて、TAF は一連のラミブジン、エンテカビル及びアデホビルピボキシル耐性変異体に対して強力な抗 HBV 活性を維持した。また、TFV でも同様の結果が得られた（試験番号 PC-320-2007；2.6.2.2.6.1 項）

2.2　副次的薬理試験

TFV-DP はほ乳類 DNA ポリメラーゼ α、β、δ、ε 及び mtDNA ポリメラーゼ γ に対して極めて弱い阻害作用しか持たず（2.6.2.3.1.1 項）、TDF 及び TFV はいずれもリガンドの宿主タンパク質への結合に対して阻害又は活性化作用を示さなかった（試験番号 V2000020；2.6.2.3.1.2 項）。

TAF（又は TFV）は細胞内 mtDNA 量、シトクロム c オキシダーゼ（COX）複合体 II 及び IV 発現、脂質蓄積並びに乳酸産生に有意な影響を及ぼさなかったことから、TAF が mtDNA 合成を阻害し、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NRTI）関連のミトコンドリア毒性を引き起こす可能性は低いことが示唆された（2.6.2.3.2.6 項）。

TAF（又は TFV）は、肝細胞株（HepG2 細胞）（PC-120-2007；2.6.2.3.2.2 項）、静止期及び分裂期の PBMC（試験番号 PC-120-2009；2.6.2.3.2.1 項）、T リンパ芽球様細胞（MT-2 及び MT-4 細胞）（試験番号 PC-120-2007；2.6.2.3.2.2 項）、ヒト初代骨芽細胞（試験番号 PC-120-2008；2.6.2.3.2.5 項）並びにヒト初代腎近位尿細管上皮細胞（RPTECs）（試験番号 P4331-00037；2.6.2.3.2.4.2 項）に対して細胞傷害性をほとんど示さなかった。また、TAF はヒトの赤血球前駆細胞及び骨髄前駆細胞の増殖にほとんど影響を及ぼさなかった（試験番号 PC-120-2016；2.6.2.3.2.3 項）。

TFV とは異なり、TAF は腎 OAT1 又は OAT3 と相互作用せず、これらのトランスポーターの基質ともならない。また、これらのトランスポーターを発現したヒト腎上皮細胞に対して OAT 依存的な細胞傷害性を示さなかった（試験番号 PC-120-2018；2.6.2.3.2.4.1 項）。以上の結果は、TAF の腎臓に対する安全性プロファイルが改善されている可能性を示唆している

In vitro 抗ウイルス活性試験の結果から、TAF は免疫不全ウイルス［HIV-1、HIV-2 及びサル免疫不全ウイルス（SIV）］に対しても特異性の高い抗ウイルス薬であることが示された。一方、検討した他のウイルス病原体［アデノウイルス、2 型デング熱ウイルス、インフルエンザ A 型ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、RS ウイルス、コクサッキーB 群ウイルス、ライノウイルス、単純ヘルペスウイルス 1 型及び 2 型、ヒトサイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ワクニシアウイルス、C 型肝炎ウイルス（HCV）］に対しては、有意な *in vitro* 活性を示さなかった（試験番号 PC-120-2003；2.6.2.3.3.1 項及び試験番号 PC-120-2004；2.6.2.3.4.1.2 項）。

TAFはヒト初代PBMCにおいて、M群サブタイプA～Gを含む全てのHIV-1 群（M、N、O）に対して幅広い抗HIV活性を示し、平均EC_{50}値は 0.10～12.0 nmol/Lの範囲であった（試験番号PC-120-2004；2.6.2.3.4.1.1 項）。TAFはHIV-2 に対しても強力な抗ウイルス活性を示し、EC_{50}値は 0.91～2.63 nmol/Lの範囲であった（試験番号PC-120-2004；2.6.2.3.4.1.2 項）。TAFの活性化PBMC及びヒトTリンパ芽球様細胞株に対する細胞傷害性は弱く、抗HIV活性に対してそれぞれ 1943 倍及び 1997 倍超の選択性を示した（試験番号PC-120-2004、PC-120-2007 及びPC-120-2009；2.6.2.3.4.2.1 項）。TDF及びTFV耐性に関与するHIV-1 RTの変異は主にK65Rであり、少なからずK70Eも関連し

ていることが明らかになっている［12、13、14］。用量漸増耐性発現試験において、TAFのHIV-1 耐性プロファイルはTFVとほぼ同様であった（試験番号PC-120-2011；2.6.2.3.4.3.1 項）。生理的濃度のTAF存在下で行ったウイルスブレイクスルー実験では、既存のTFV耐性変異を有するほとんどのウイルスにおいてブレイクスルーが抑制され、TAFは既存のTDF耐性ウイルスに対して抗ウイルス効果を示すことが示唆された（試験番号PC-120-2013；2.6.2.3.4.3.2 項）。様々なN(t)RTI 耐性変異を有する一連のHIV-1 臨床分離株に対して、TAFの抗ウイルス作用に対する感受性はTFVとほぼ同様であり、両薬剤のEC_{50}値の平均変化倍率に強い相関が認められた（試験番号PC-120-2014；2.6.2.3.4.4.1 項）。

2.3　安全性薬理試験

中枢神経系、心血管系、消化管系及び腎臓系に対する TAF の影響を評価した。*In vivo* 安全性薬理試験は、50 mmol/L クエン酸に溶解した TAF（モノフマル酸塩）を使用して実施した。*In vitro* ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）試験では、TAF（ヘミフマル酸塩）をジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid（HEPES）緩衝生理食塩水で希釈し、最終濃度を 0.3% DMSO とした。

TAF（モノフマル酸塩）単回経口投与で、ラットの中枢神経系（1000 mg/kg）（試験番号 R990188；2.6.2.4.1 項）及び腎臓系（1000 mg/kg）（試験番号 R990186；2.6.2.4.4 項）並びにイヌの心血管系（100 mg/kg）（試験番号 D2000006；2.6.2.4.2.2 項）に対する薬理学的作用は認められなかった。ラットに TAF（モノフマル酸塩）1000 mg/kg を単回経口投与した時、胃排出の低下が認められたが、100 mg/kg では認められなかった（試験番号 R990187；2.6.2.4.3 項）。TAF（1 及び 10 µmol/L）は hERG カリウム電流に対する有意な阻害作用を示さなかった。（試験番号 PC-120-2005；2.6.2.4.2.1 項）。

2.4　薬力学的薬物相互作用

HBV を導入した HepAD38 細胞を用いた *in vitro* 相互作用試験で、TFV と N(t)RTI との併用による抗 HBV 活性の相加効果～相乗効果が示された（試験番号 PC-174-2006；2.6.2.5.2.1 項）。また、HepAD38 細胞において、プロテアーゼ阻害剤（PI）は TAF の抗 HBV 活性に対して相互的拮抗作用を示さなかった（試験番号 PC-320-2004；2.6.2.5.2.2 項）。HIV-1_{IIIB}感染 MT-2 細胞を用いた *in vitro* 相互作用試験において、TAF は N(t)RTI、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NNRTI）、PI 及びインテグラーゼ阻害剤（INSTI）との併用により相加的～相乗的な抗 HIV 活性を示した（試験番号 PC-120-2002；2.6.2.5.3.1 項）。CatA を発現するヒト初代 $CD4^+$ T 細胞では、テラプレビル又は boceprevir と TAF との併用により TAF の抗 HIV-1 活性が低下した（試験番号 PC-120-2001；2.6.2.5.3.2 項）。HCV ジェノタイプ 1a Huh-7 レプリコン細胞を用いた *in vitro* 相互作用試験において、TAF は HCV PI の抗 HCV 活性及び細胞傷害性に有意な影響を及ぼさなかった（試験番号 PC-320-2001；2.6.2.5.4.1 項）。

3　薬物動態

マウス、ラット、イヌ、ウサギ及びサルで TAF の吸収、分布、代謝及び排泄を評価した。また、*in vitro* 試験で TAF の吸収、代謝及び薬物動態学的薬物相互作用を評価した。以下にこれらの試験結果を要約する。

3.1　分析法

TK 試験及び薬物動態試験での濃度測定のために、生体試料中定量法のバリデーション試験を実施した。全ての定量法で特異性、感度、直線性、日内及び日間精度及び真度を適切に評価した。全ての生体試料中定量法はデータの信頼性を確保するために適切なプロトコル及び文書の下に実施した。

3.2　吸収（*In vitro* 試験及び単回投与試験）

ヒト結腸癌由来の細胞株（Caco-2）単層膜細胞を用いた試験で、TAF の forward 方向の膜透過性は濃度依存的に増加し、efflux ratio が低下した。また、P 糖蛋白質（P-gp）の阻害剤であるシクロスポリン A（CsA）添加によって、efflux ratio が減少し、forward 方向の膜透過性が増加したことから、飽和性の排出トランスポーターの関与が示唆された。（試験番号 AD-120-2037；2.6.4.3.1 項）。

TAF 及び／又は TFV 単回投与後の薬物動態は、雄 CD-1 マウス［TAF（モノフマル酸塩及びヘミフマル酸塩）］、雌雄 TgRasH2（001178-W）野生型マウス［TAF（ヘミフマル酸塩）］（試験番号 AD-120-2014 及び AD-120-2016；2.6.4.3.2.1.1 項）及びラット［TAF（モノフマル酸塩及びヘミフマル酸塩）］（試験番号 AD-120-2015、R990130 及び R2000065；2.6.4.3.2.1.2 項）では経口投与で、イヌでは TAF（モノフマル酸塩）の静脈内投与又は TAF（ジアステレオマーA）、GS-7339（ジアステレオマーB）、GS-7171（ラセミ混合物）又は TAF（モノフマル酸塩）の摂食／絶食下経口投与（試験番号 99-DDM-1278-001-PK 及び AD-120-2034；2.6.4.3.2.1.3 項）で評価した。血漿中 TAF は速やかに TFV に変換され、ラット血漿中に TAF は検出されなかった。また、アカゲサルで TAF（モノフマル酸塩）単回経口投与後の血漿中 TAF 及び TFV 並びに PBMC 中 TFV 濃度を検討した（試験番号 P2000087；2.6.4.3.2.1.4 項）。さらに、イヌで TAF 10 mg/kg 単回経口投与後の肝臓中薬物動態プロファイルを検討した。肝臓での主代謝物は活性代謝物である TFV-DP であり、投与 4 時間後に C_{max}56.4 µg/mL に達し、投与後 24 時間まで同様の濃度で推移した（試験番号 AD-120-2034；2.6.4.3.2.1.3 項）。これらの結果から、毒性試験で選択した動物種での TAF の吸収は十分であることが確認された。*In vitro* 試験でみられた濃度依存的な膜透過性と一致して、イヌでの TAF の絶対的アベイラビリティは用量依存的に上昇し、10 mg/kg では 14.3%であった［6］。胆管カニューレ挿入（BDC）イヌでの[^{14}C]-TAF 単回経口投与後の尿及び胆汁中排泄率から少なくとも投与量の 41%が吸収されると考えられた（試験番号 AD-120-2007；2.6.4.6.2.1 項）。なお、投与量の 41%が吸収され、14.3%が循環血中に移行することから、肝抽出率は約 65%であると考えられた。これはイヌの S9 分画を用いた安定性試験の結果から算出される肝抽出率（60.5%）と一致した（試験番号 AD-120-2023；2.6.4.5.1.1 項）。

3.3　反復投与

TAF 反復投与後の TFV の薬物動態は、イヌでの薬物動態試験（試験番号 AD-120-2033；2.6.4.3.2.2.3 項）並びにマウス（試験番号 TX-120-2006 及び TX-120-2007；2.6.4.3.2.2.1 項）、ラット（試験番号 R990182 及び TOX-120-001；2.6.4.3.2.2.2 項）、イヌ（試験番号 D990175-PK 及び TOX-120-002；2.6.4.3.2.2.3 項）及びサル（試験番号 P2000114-PK：2.6.4.3.2.2.4 項）での TK 試験で評価した。

雄ビーグル犬に TAF（ヘミフマル酸塩）を 8.29 mg/kg で 1 日 1 回 7 日間経口投与し、投与 1 日目（血漿中）及び 7 日目（血漿及び肝臓中）の薬物動態プロファイルを評価した（試験番号 AD-120-2033；2.6.4.3.2.2.3 項）。TAF は、投与 1 日目及び 7 日目ともに速やかに吸収され、$t_{1/2}$ は短く、0.3 時間であった。TAF の急速な消失とともに血漿中 TFV 濃度が上昇した。TFV は血漿中主代謝物であり、投与 1 日目及び 7 日目の C_{max} は 0.42 µg/mL（1.47 µmol/L）及び 0.61 µg/mL（2.12 µmol/L）であった。活性代謝物である TFV-DP は、イヌ肝臓中で効率的に生成され、投与 7 日目の投与 4 及び 24 時間後に 242 µmol/L 及び 153 µmol/L に達した。

マウスに 13 週間、サルに 4 週間反復経口投与したときには TFV の蓄積性はみられなかったが、ラットに 26 週間及びイヌに 39 週間反復経口投与したときには、若干の蓄積性（約 3 倍）がみられた。

3.4　分布

3.4.1　組織内分布

マウス（試験番号 AD-120-2011；2.6.4.4.1.1 項）、ラット（試験番号 AD-120-2020；2.6.4.4.1.2 項）及びイヌ（試験番号 AD-120-2009 及び D990173-BP；2.6.4.4.1.3 項）での[^{14}C]-TAF 経口投与後の放射能は、検討した全ての動物種において、各組織に広範に分布した。肝臓において高濃度の放射能が認められ、これは高い肝抽出率と一致した。腎臓においても高濃度の放射能が認められた。マウスでの脳及び精巣中放射能濃度は低かった。ラットでメラニンへの結合はみられなかった。有色マウスにおけるブドウ膜及び有色皮膚への分布傾向から、放射能はメラニン含有組織に選択的に結合しないことが示唆された。

イヌでの[^{14}C]-TAF 投与 24 時間後のリンパ組織（腸骨、腋窩、鼠径部、腸間膜リンパ節及び脾臓）の放射能は、[^{14}C]-TDF 投与後よりも 5.7～15 倍高かった［3］。イヌでの放射能濃度は、肺、甲状腺、脾臓、骨格筋、骨髄及び他のいくつかの組織でも TDF 投与後に比較して高かった。しかし、TAF の臨床用量は TDF の 1/10 以下であることから、これらの組織における TAF 及び／又は代謝物濃度は、TDF 投与後と同程度（あるいはそれ以下）であると考えられる。

3.4.2　タンパク結合

TAF は血漿中エステラーゼによる加水分解を受けるため、げっ歯類の血漿中では非常に不安定であることから、*in vitro* 試験でのタンパク結合率の評価はイヌ及びヒトでのみ実施した（試験番

号 AD-120-2026；2.6.4.4.2 項）。TAF の非結合型分率はイヌ及びヒトで 48.0%及び 46.8%であり、タンパク結合率は中程度であった。*In vitro* 試験で得られたこれらのタンパク結合率は、複数のヒト *ex vivo* 試験で認められた値よりも高い値であった（全ての被験者から算出した TAF の平均非結合型分率は 14%～23%）（試験番号 GS-US-120-0108；2.7.2.2.5.1.1 項及び GS-US-1220-0114；2.7.2.2.5.1.2 項）。*Ex vivo* 試験で得られた値の方が臨床的により重要であると考えられたため、薬物相互作用の評価には、*ex vivo* 試験で得られた 20%を非結合型分率として用いた。

なお、TFV のタンパク結合率は、ヒト血漿及び血清で 10%未満と非常に低かった（試験番号 P0504-00039.1；2.6.4.4.2 項）。

3.4.3　胎盤通過

妊娠ラットに TAF（モノフマル酸塩）を 200 mg/kg/day 及び 250 mg/kg/day まで反復経口投与した生殖発生毒性試験の用量設定試験及び本試験（試験番号 TX-120-2001 及び TX-120-2002；2.6.4.4.3.1 項）で TFV の蓄積性はみられなかった（最大で約 2.5 倍）（試験番号；2.6.4.4.3.1 項）。ウサギでの用量設定試験及び本試験でも蓄積性はみられなかった（約 2 倍）（試験番号 TX-120-2004 及び TX-120-2005；2.6.4.4.3.2 項）。

アカゲザルで TFV の胎盤通過試験を実施した。TFV は胎盤を通過したが胎児での濃縮はみられず、TFV の胎児／母体血清中濃度比は 0.5 以下であった（試験番号 96-DDM-1278-005；2.6.4.4.3.3 項）。

3.4.4　乳汁移行

授乳ラット及びアカゲザルでの検討で TFV の乳汁移行性が示された（試験番号 R990202-PK；2.6.6.6.3 項及び P2000116；2.6.4.4.3.4 項）。TFV の乳汁／血漿又は血清中濃度比はラットで 0.11～0.24、アカゲサルで 0.19～0.22 であった。

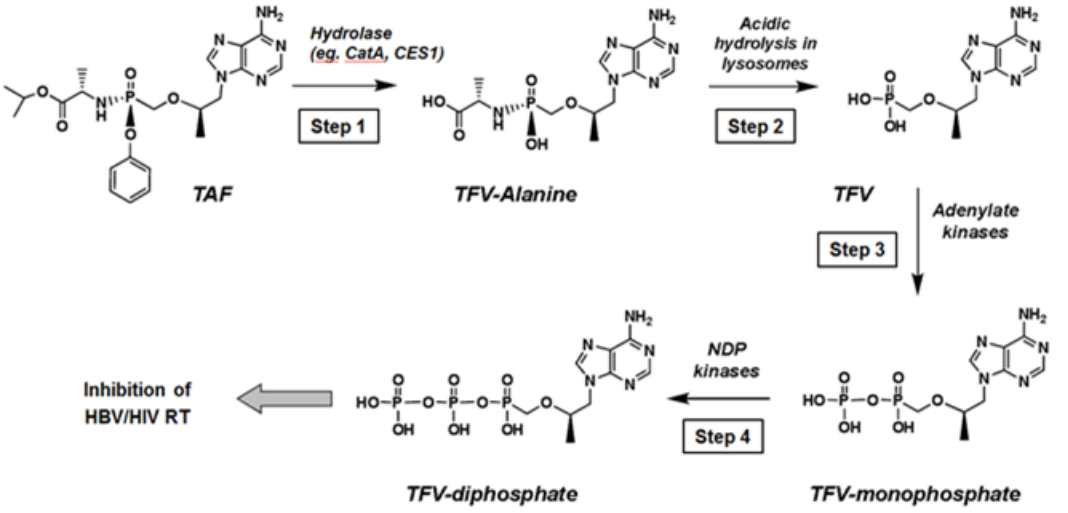
3.5　代謝

3.5.1　細胞内代謝

TAFは細胞内でTFVに代謝された後、細胞内ヌクレオチドキナーゼによってリン酸化され、テノホビルーリン酸（TFV-MP）及びTFV-DPになる。TFV-DPは活性代謝物である。TAFの代謝に関与する主要な酵素は初代肝細胞ではCES1［4、5、15］、PBMCではCatAである。これらの過程は、低親和性／高活性であるため、他剤により容易には阻害されない（図 2.4- 1）。

TAF のヒト初代肝細胞での活性化を TDF 及び TFV と比較した（試験番号 AD-120-2017；2.6.4.5.1.3 項）。ヒト初代肝細胞に TAF、TDF 又は TFV が 5 µmol/L になるように添加し、24 時間インキュベートした。インキュベート後の肝細胞中 TFV-DP 濃度は、それぞれ 1470、302 及び 12.1 pmol/10^6 cells であったことから、細胞内 TFV-DP 濃度は TAF とのインキュベーションで、TDF 及び TFV のそれぞれ約 5 倍及び約 120 倍となることが示された。なお、ヒト初代肝細胞での細胞内 TFV-DP の $t_{1/2}$ は 24 時間超であった［5］。

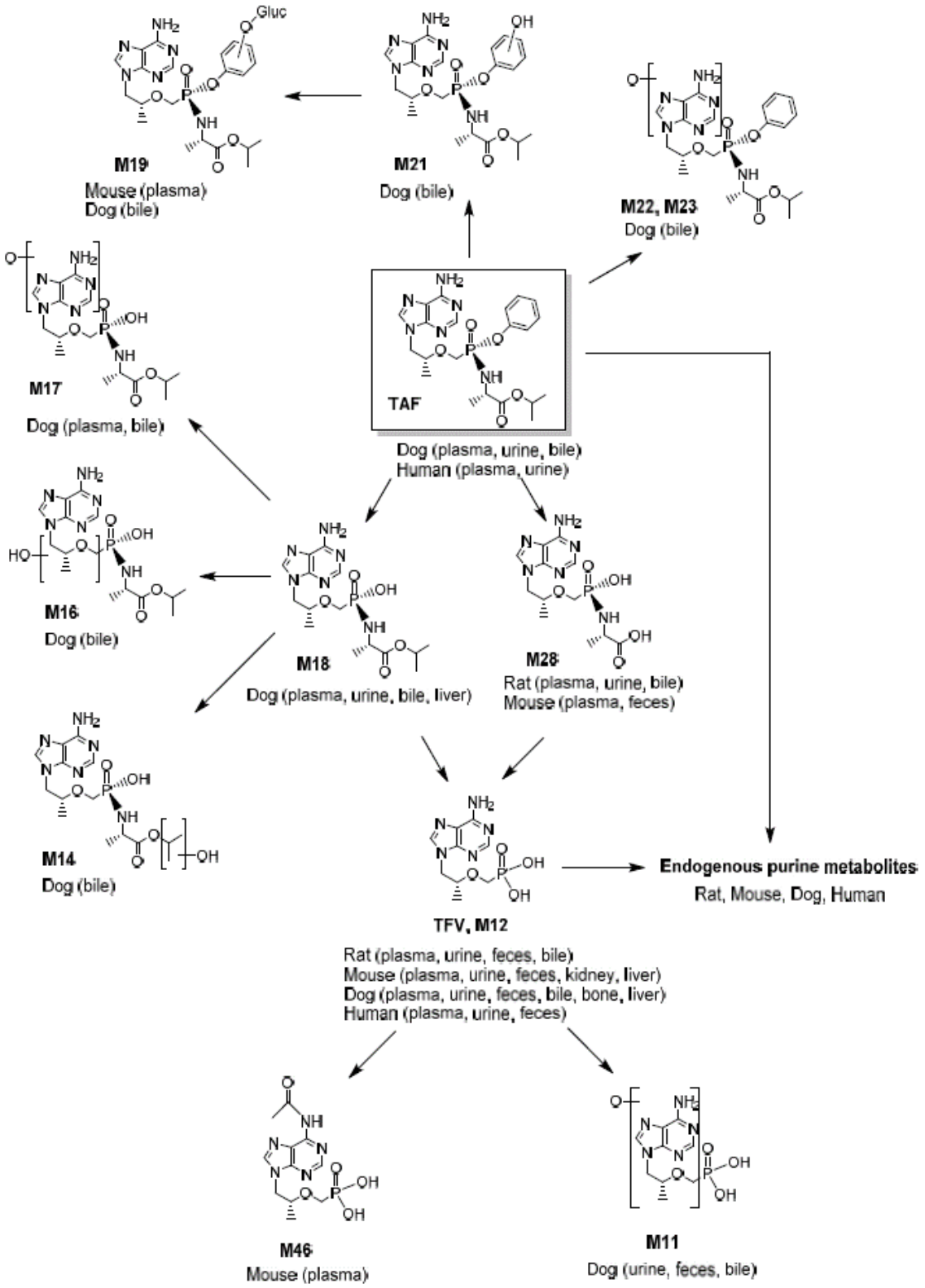
図 2.4- 1　　TAFの細胞内活性化経路



3.5.2　推定代謝経路

マウスの血漿、尿、糞、腎臓、肝臓及び鼻甲介（試験番号 AD-120-2012；2.6.4.5.2.1 項）、ラットの血漿、尿、胆汁及び糞（試験番号 AD-120-2021；2.6.4.5.2.1 項）、並びにイヌの血漿、尿、胆汁、糞、骨及び肝臓（試験番号 AD-120-2008；2.6.4.5.2.1 項）において TAF の代謝プロファイルを検討した。[^{14}C]-TAF 単回経口投与後のヒトの血漿、尿及び糞についても、代謝物プロファイルを検討した（試験番号 GS-US-120-0109；2.7.2.2.2.1.2 項）。マウス、ラット、イヌ及びヒトの結果に基づいた推定代謝経路を図 2.4- 2 に示す。

図 2.4- 2　　TAFの推定代謝経路



(Source: AD-120-2008, AD-120-2012, AD-120-2021 and GS-US-120-0109)

3.5.3　*In vitro* 代謝

TAF の代謝に関与するシトクロム P450（CYP）同定を実施した（試験番号 AD-120-2004；2.6.4.5.1.2 項）。TAF は CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 又は CYP2D6 で代謝されなかった。なお、TAF は CYP3A4 で緩徐に代謝され、代謝速度は 1.9 min^{-1} であった。これは陽性対照であるテストステロンの代謝速度の 26.6%であった。

3.5.4　*In vivo* 代謝

マウス、ラット、イヌ及びヒトでの試験から、全ての動物種において、ヒポキサンチン、キサンチン、アラントイン及び尿酸などの内因性プリン代謝物が検出された（試験番号 AD-120-2008、AD-120-2012 及び AD-120-2021；2.6.4.5.2.1 項、試験番号 GS-US-120-0109；2.7.2.2.2.1.2 項）。ヒト血漿を除いて、全ての動物種の血漿、尿及び糞中における TAF 関連物質の大部分を占めたのは TFV であった。ヒト血漿中では尿酸が主代謝物であり、96 時間までの生成量は総濃度－時間曲線下面積（AUC）の 73.9%を占めた。ラット胆汁中では M28 が主代謝物であり、胆汁中に回収された総放射能の 63%を占めた。イヌ胆汁中では M18 及びその酸化体である M16 が主代謝物であり、胆汁中に回収された総放射能の 29%及び 38%を占めた。イヌ胆汁中では、様々な酸化代謝物が認められた。ヒトに特有の代謝物は認められなかった。

マウスの腎臓、肝臓及び鼻甲介について、TAF 関連代謝物を検討した（試験番号 AD-120-2012；2.6.4.5.2.1 項）。腎臓及び肝臓では、放射能のほとんどが TFV に由来するものであり、鼻甲介で同定された主代謝物はキサンチン（内因性のプリン代謝物）であった。イヌの骨及び肝臓でも、これらの組織に含まれる放射能のほとんどは、TFV に由来するものであった（試験番号 AD-120-2008；2.6.4.5.2.1 項）。

M18（イソプロピルアラニニルが付加した TFV）及び M28（TFV-アラニン）は、細胞内で TAF から TFV へ代謝される際の中間代謝物と考えられる。イヌを用いた代謝プロファイリング試験では、M28 は検出されなかったが、過去の試験では、投与 15 分後のイヌ血漿中において定性的に検出されている［6］。M18 は、血漿、尿及び肝臓で、微量代謝物として検出された。胆汁中では、比較的高濃度の M18 が検出された。M28 濃度は、ラット及びマウスの血漿では低く、ラット胆汁中では比較的高濃度で検出された。

3.6　排泄

3.6.1　尿、糞及び胆汁中排泄

マウス、ラット及びイヌでの[^{14}C]-TAF 経口投与後の放射能の大部分は、全ての動物種において糞中又は尿中に排泄された（試験番号 AD-120-2011；2.6.4.6.1.1 項、AD-120-2020；2.6.4.6.1.2 項及び AD-120-2007；2.6.4.6.1.3 項）。BDC 及び未処置ラットで[^{14}C]-TAF 5 mg/kg 単回経口投与後の排泄を検討した（試験番号 AD-120-2020；2.6.4.6.1.2 項）。BDC ラットでは投与後 168 時間までの糞、尿及び胆汁中に投与量の 72.6%、23.2%及び 2.11%の放射能が排泄された。BDC ラットでの尿及び胆汁中放射能回収率から、少なくとも 25%が吸収されたと考えられた。BDC ラットでの経口投与後の総回収率は 99.9%であった。BDC 及び未処置雄イヌで[^{14}C]-TAF 15 mg/kg 単回経

口投与後の排泄を検討した（試験番号 AD-120-2007；2.6.4.6.1.3 項）。BDC イヌでは投与後 168 時間までの糞、尿及び胆汁中に投与量の 42.7%、26.5%及び 14.0%が排泄された。BDC イヌでは、胆汁中に排泄された放射能が高度であったことから、胆汁中排泄がイヌにおける放射能の主な排泄経路の一つであることが示された。BDC イヌでの総回収率は 86.2%であった。

また、全ての動物種で、TFV の主要排泄経路は腎排泄であった。[^{14}C]-TFV 静脈内投与後の放射能は、ラットでは 24 時間までに 85.2%、イヌでは 48 時間までに 70%が尿中に排泄された（試験番号 96-DDM-1278-001；2.6.4.6.1.2 項及び 96-DDM-1278-002；2.6.4.6.1.3 項）。

3.7　薬物動態学的薬物相互作用

ヒトにおける TAF 経口投与後の TAF 及び TFV の PK パラメーターを表 2.4-1 に示す。TAF の非結合型 C_{max} は、複数のヒト *ex vivo* 試験から得られた非結合型分率 20%を用いて算出した。*In vitro* 試験で得られた TAF の非結合型分率は、この値よりも若干高値であったが、*ex vivo* 試験で得られた値の方が臨床的に重要であると考えられたため、*ex vivo* 試験で得られた値を使用した。

表 2.4-1.　ヒトにおけるTAF経口投与後の定常状態でのTAF及びTFVの薬物動態パラメーター

Parameter	TAF	TFV
Dose (mg)	25	–
Total C_{max} (µmol/L)	0.37	0.060
Unbound C_{max} (µmol/L)[a]	0.075	0.060
Intestinal (µmol/L)[b]	210	–
$C_{hep,\ inlet}$ (µmol/L)[c]	0.71	–

a　Calculated based on percent unbound values of 20% for TAF (M2.7.2.2.5.1.1 and M2.7.2.2.5.1.2) and 99.3% for TFV.
b　Estimated based on TAF 25 mg dose
c　Estimated total hepatic inlet (portal vein) concentration calculated based on TAF 25 mg dose according to Obach et al.[16].
Absorption rate constant of 0.01 min^{-1} and human hepatic blood flow of 1500 mL/min were used for estimation.
(Source: Population PK Report, M2.7.2.3.2.1.2)

3.7.1　CYP 阻害

TAF 及び TFV の CYP に対する阻害作用を *in vitro* 試験で評価した（試験番号 AD-120-2003、V990172-104；2.6.4.7.1 項）。TAF の CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A に対する阻害活性を 25 µmol/L まで評価したところ、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP2D6 に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）値は 25 µmol/L 超であった。TAF は CYP3A が関与するミダゾラム又はテストステロンの代謝に対する弱い阻害作用を示したが、IC_{50} 値はそれぞれ 7.6 又は 7.4 µmol/L であった。臨床薬物相互作用試験において、TAF は CYP3A 基質であるミダゾラム又はリルピビリンへの曝露量に影響を及ぼさなかったことから（試験番号 GS-US-120-1538；2.7.2.2.6.1.3 項及び GS-US-120-1554；2.7.2.2.6.1.4 項）、この弱い CYP3A 阻害は、臨床的に意味のあるものではないと考えられた。TFV は 100 µmol/L まで CYP1A2、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4 を阻害しなかった。

TAF の CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A に対する時間依存的阻害を検討した（試験番号 AD-120-2040；2.6.4.7.1 項）。TAF は 50 µmol/L でいずれの CYP 対しても時間依存的及び補酵素依存的阻害を示さなかった。検討した CYP の中で最大の阻害作用は CYP2C8 に対する 17.4%であった。

3.7.2　UGT1A1 阻害

TAF による UGT1A1 に対する IC_{50} 値は 50 µmol/L 超であり、UGT1A1 に対する阻害作用はないと考えられた（試験番号 AD-120-2006；2.6.4.7.2 項）。

3.7.3　肝酵素誘導作用

TAF の芳香族炭化水素受容体（AhR）及びプレグナン X 受容体（PXR）を介した薬物代謝酵素及びトランスポーターの誘導作用について検討した（試験番号 AD-120-2005；2.6.4.7.3 項）。TAF による PXR の活性化は TAF 15 及び 50 µmol/L で、リファンピシンによる最大誘導効果の 5%未満及び 23%にすぎなかった。TAF は、検討した最高濃度である 50 µmol/L まで、AhR を活性化しなかった。したがって、TAF は AhR 及び PXR を介した誘導作用を示さないと考えられた。

TAF の CYP、P-gp 及び UGT1A1 のメッセンジャーリボ核酸（mRNA）並びに酵素活性に対する誘導作用を検討するために、3 例の異なるドナーから得られたヒト初代肝細胞に TAF を 1、10 及び 100 µmol/L になるように添加して 3 日間処理した（試験番号 AD-120-2032；2.6.4.7.3 項）。細胞傷害性を示す TAF 100 µmol/L では、細胞生存率が有意な影響を受け、TAF により肝細胞の mRNA レベルは上昇するが CYP 代謝活性は低下するという相反する反応がみられた。細胞傷害性を示さない TAF 濃度（1 及び 10 µmol/L）では、mRNA レベル及び CYP 活性の有意な上昇は認められなかった。10 µmol/L の TAF で処理後、CYP1A2 及び CYP3A4 の mRNA 濃度は 3.0 倍及び 8.3 倍に上昇し、これはそれぞれの陽性対照による誘導作用の 4%及び 8%に相当した。したがって、TAF は、臨床的に意味のある濃度（1 µmol/L）においては、ほとんど又は全く CYP を誘導しないことが示された。P-gp 及び UGT1A1 の mRNA の有意な誘導作用は認められなかった（10 µmol/L までは 2 倍未満）。

さらに、TAF は臨床薬物相互作用試験においてミダゾラム又はリルピビリンへの曝露量に影響を及ぼさなかったことから、臨床的に意味のある誘導剤ではないと考えられた（試験番号 GS-US-120-1538；2.7.2.2.6.1.3 項及び GS-US-120-1554；2.7.2.2.6.1.4 項）。

3.7.4　TAF の代謝

経口投与後の TAF は消化管から吸収される際に、消化管エステラーゼ及び／又は CYP によって代謝される可能性がある。小腸細胞画分を用いて、TAF と HIV PI であるアタナザビル又はダルナビル、CYP 阻害剤であるリトナビル又はコビシスタット（COBI）とをインキュベートしたところ、各阻害剤濃度 100 µmol/L まで TAF の代謝は影響を受けなかった（試験番号 AD-120-2027；2.6.4.7.4 項）。

また、ヒト初代肝細胞でのTAF活性化に関与する酵素を明らかにするため、TAFと共に、既知のCatA阻害剤（テラプレビル及びboceprevir）、CES1 阻害剤（ビスp-ニトロフェニルフォスフェ

ート、BNPP)、CYP3A4 及びP-gp阻害剤（COBI)、又はテラプレビル＋BNPPを細胞に添加し、インキュベートした（試験番号AD-120-2031；2.6.4.7.4 項)。ヒト初代肝細胞において、TAFは主にCES1 によって加水分解され、CatAも関与することが示された。CES1 には遺伝子多型がいくつか同定されているが、頻度は非常に低い。G143Eのヘテロ接合体は 2%～4%、ホモ接合体は 0.05%、並びにD260fsの発現頻度は非常に稀である［17、18］。B型肝炎ウイルス感染被験者の試験において、合計 42/51 例（82.4%）の患者でCES1 のrs71647871（G143E）変異に関する遺伝子型判定を実施した結果、全ての患者は、標準ホモ接合体遺伝子型を保有しており、マイナーアレルの保有者はいなかった。さらに、TAFは肝臓においてCES1 とCatAの両者によって活性化されるため、CES1 の遺伝子多型がTAFの活性化に著しい影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

3.7.5　トランスポーターを介した薬物相互作用

TAF 及び TFV が薬物トランスポーターを阻害する可能性、又は薬物トランスポーターの基質となる可能性を *in vitro* 試験で評価した。表 2.4-2 に要約を示す。これらの結果から、TAF 及び TFV は臨床濃度において、検討したいずれのトランスポーターも阻害しないと考えられた。したがって、TAF 及び TFV はトランスポーターを介した薬物相互作用において相互作用薬になるとは考えにくい。

表 2.4-2.　　TAF及びTFVの各トランスポーターに対する阻害作用及び基質となる可能性の検討結果

Transporter	Substrate Potential (y/n)		Inhibition Potential, IC_{50} (μmol/L)		Report
	TAF	TFV	TAF	TFV	
P-gp	y	n	>100	>1000	AD-120-2018 AD-236-2004 AD-120-2019 AD-236-2003
BCRP	y	n	>100	>100	AD-120-2018 AD-236-2005 AD-120-2019 AD-236-2003
BSEP	ND	ND	>100	>100	AD-236-2008 AD-120-2036
OATP1B1	y	ND	>100	>100	AD-120-2022 AD-120-2019 AD-236-2006
OATP1B3	y	ND	>100	>100	AD-120-2022 AD-120-2019 AD-236-2006
MATE1	ND	ND	>100	>300	AD-120-2036 AD-104-2012
OAT1	n	y	>100	ND	PC-104-2010 AD-120-2036
OAT3	n	y	>100	>1000	PC-104-2011 AD-120-2036 PC-103-2001
OCT1	n	n	>100	>100	AD-120-2036 PC-103-2001 AD-236-2008
OCT2	ND	n	>100	>300	AD-236-2011 AD-120-2036 PC-103-2001 AD-104-2012
MRP1	ND	n	ND	>500	PC-104-2014
MRP2	ND	n	ND	>100	AD-104-2001
MRP4	ND	y[a]	ND	ND	AD-104-2001

BCRP = breast cancer resistance protein; BSEP = bile salt excretory pump; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; P-gp = P-glycoprotein, MRP1 2, 3, or 4 = multidrug resistance associated protein 1, 2, or 4; ND = not determined; OAT1 or 3 = organic anion transporter 1 or 3; OATP1B1 or B3 = organic anion transporting polypeptide 1B1 or B3; OCT1 or 2 = organic cation transporter 1
a　Imaoka et al 2007 [19]

TAF は消化管排出トランスポーターである P-gp 及び乳癌耐性蛋白（BCRP）の基質である。*In vitro* 試験では排出トランスポーターの阻害剤である COBI 又は CsA 存在下で、TAF の吸収が増加した（試験番号 AD-120-2013；2.6.4.7.5.1.1 項及び AD-120-2037；2.6.4.3.1 項）。COBI は消化管排出トランスポーターの弱い阻害剤であるが、消化管において高濃度の COBI が P-gp を阻害するこ

とで吸収が増大する結果、TAF の曝露が上昇する可能性がある。イヌでの CsA 75 mg 前処置群における TAF 2 mg/kg 経口投与後の絶対的バイオアベイラビリティは未処置群に比べて 10 倍上昇したが、TFV の PK プロファイルに対する影響はわずかに上昇する程度であった（試験番号 AD-120-2035；2.6.4.7.5.1.1 項）。TAF の曝露上昇に一致して前処置群における PBMC 中の TFV-DP 濃度も未処置群に比べて 2 倍上昇した。

TAF はヒト初代肝細胞に効率よく取り込まれ、代謝された。TAF は OATP1B1/1B3 非発現チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に効率的に取り込まれ、取り込み速度は 9.0 pmol/min/10^6 cells であったことから、TAF の受動輸送は高いことが示された。OATP1B1 又は OATP1B3 発現 CHO 細胞での TAF の取り込み速度は更に高く、それぞれ 12.0 又は 24.1 pmol/min/10^6 cells であり、このトランスポーター依存性の取り込みは、リファンピシンによって阻害された。なお、受動輸送及び能動輸送の陽性対照としてアンチピリン及びアトルバスタチンを用いた。本結果から、TAF は肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であることが示された（試験番号 AD-120-2022；2.6.4.7.5.1.1 項）。ヒト初代肝細胞で、OATP 阻害剤であるリファンピシンの TAF 取り込みに対する阻害作用を検討した。その結果、TAF の肝取込みにおける OATP の寄与は小さいことが示された（試験番号 AD-120-2042；2.6.4.7.5.1.1 項）。以上のことから、TAF の肝取り込みは主に受動拡散によるものと考えられた。したがって、輸送活性に影響を及ぼすこれらのトランスポーターの阻害又は遺伝子多型によって、TAF の曝露量が若干影響を受ける可能性はあるが、TAF の受動的透過性が高いことを考慮すると、OATP1B1 及び OATP1B3 活性の変動は臨床的に意味のある影響を及ぼさないと考えられる。

TAF の P-gp、BCRP、OAT1、OAT3 及び organic cation transporter（OCT）2 の基質に対する阻害作用は弱いか、又は阻害しないと考えられた（試験番号、AD-120-2018、AD-120-2019；2.6.4.7.5.1.1 項及び AD-120-2036；2.6.4.7.5.2.1 項）。TAF の bile salt export pump（BSEP）、OCT1 及び multidrug and toxin extrusion protein（MATE）1 に対する弱い阻害作用がみられたが、血漿中濃度の 200 倍以上に相当する 100 μmol/L でも 50%の阻害であった。したがって、TAF はトランスポーターを介した薬物相互作用で相互作用薬になるとは考えにくい。

TFV の主要排泄経路は、糸球体濾過と尿細管分泌の両者による腎排泄である。TFV の腎排泄におけるトランスポーターの役割及び併用される可能性のある薬剤との相互作用を評価するため、様々な取り込み及び排出トランスポーターで TFV の相互作用について検討した。

*In vitro*試験の結果から、TFVの尿細管分泌には近位尿細管の取り込みトランスポーターである OAT1 及び排出トランスポーターである多剤耐性関連蛋白質（MRP）4 が関与していると考えられた（試験番号PC-103-2001 及びAD-104-2001；2.6.4.7.5.2.2 項、AD-104-2002；2.6.4.7.5.1.2 項）［20、21］。また、OAT3 もTFVの尿細管での取り込みにおいて副次的役割を果たす可能性があると考えられた。一方、P-gp及びMRP2 は、いずれもTFVの尿細管排出に関与しなかった。TFVの尿細管取り込みに関与する主要トランスポーターとして考えられるOAT1 について、他の腎排泄される治療薬（抗生物質、抗炎症薬、COBIやPIを含めたその他の抗ウイルス薬など）との薬物間相互作用が生じる可能性を評価した。生理学的条件下で、これら薬剤はOAT1 及びOAT3 を介したTFV輸送に影響を及ぼさなかったことから、TFVとの腎臓での相互作用が生じる可能性は低いと考えられた（試験番号PC-104-2010 及びPC-104-2011；2.6.4.7.5.2.2 項）。また、PIであるアタ

ザナビル、ロピナビル及びリトナビルは、MRP4 が関与するTFVの受動輸送を介した排泄に影響を及ぼさなかった［21］。*In vitro*での相互作用試験の結果から、これらのPIが腎近位尿細管におけるTFVの蓄積又はTFVの腎排泄に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。

なお、近位尿細管の基底膜における TFV の再吸収に MRP1 の寄与はないと考えられた（試験番号 PC-104-2014；2.6.4.7.5.2.2 項）。

3.8　薬物動態のまとめ

TAF の吸収、分布、代謝及び薬物相互作用を明らかにするための包括的な非臨床試験を実施した。本項に記載した非臨床薬物動態試験の結果は、毒性試験及び臨床試験の結果を理解する際に基となる情報である。

毒性試験で選択した動物種における TAF 経口投与後の曝露は十分であった。イヌでの TAF 経口投与時の肝抽出率は約 65%であり、肝臓では高濃度の活性代謝物 TFV-DP が検出された。TFV-DP のみかけの $t_{1/2}$ は 20 時間超であった。イヌ肝臓での長い TFV-DP の $t_{1/2}$ と一致して、ヒト初代肝細胞内での TFV-DP の $t_{1/2}$ も 24 時間超であった［5］。マウス、ラット及びイヌにおける[^{14}C]-TAF 経口投与後の放射能は、検討した全動物種において各組織に広範に分布した。肝臓で高濃度の放射能が認められ、これは高い肝抽出率と一致した。腎臓でも高濃度の放射能が認められた。マウスでの脳及び精巣の放射能濃度は低かった。有色マウスにおけるブドウ膜及び有色皮膚への分布傾向から、放射能はメラニン含有組織に選択的に結合しないことが示唆された。また、ラットでもメラニンへの結合はみられなかった。

マウス、ラット及びイヌにおける TAF の代謝についてヒトと比較した。ヒトを含めた全動物種において、内因性のヒポキサンチン、キサンチン、アラントイン及び尿酸などのプリン代謝物の生成が示された。ヒト血漿を除いた全動物種の血漿、尿及び糞中主代謝物は TFV であった。ヒト血漿中では尿酸が主代謝物であり、96 時間までの生成量は総 AUC の 73.9%であった。なお、ヒト特有の代謝物は認められなかった。また、ヒトでは細胞内での TAF から TFV への代謝の際に生成される中間代謝物（M18 及び M28）は検出されなかった。ヒト初代肝細胞及び PBMC での TAF から TFV への代謝には、それぞれ主に CES1 及び CatA が関与していると考えられた。TFV は、さらに細胞内ヌクレオチドキナーゼによって TFV-DP にリン酸化される。これらの過程は、低親和性／高活性であるため、他剤により容易には阻害されない。

マウス、ラット及びイヌでの[^{14}C]-TAF 経口投与後の放射能の大部分は、いずれの動物種でも糞及び尿中に排泄された。BDC イヌでの胆汁中排泄率が高かったことから、胆汁中排泄がイヌでの[^{14}C]-TAF 関連物質の主な排泄経路の一つであると考えられた。放射能の総回収率はいずれの動物種でも高かった。

TAF は、*in vitro* 試験で認められた CYP3A に対する弱い阻害を除いて、UGT1A1 及び CYP を阻害しなかった。なお、臨床薬物相互作用試験で TAF が CYP3A の基質であるミダゾラム又はリルピビリンの曝露に影響を与えなかったことから、TAF の *in vitro* 試験でみられた CYP3A に対する弱い阻害は臨床的に意味のある阻害作用ではないと考えられた。TAF は、CYP、UGT1A1 又は P-gp に対して、臨床的に意味のある誘導作用を示さなかった。また、TAF はトランスポーターを介した薬物相互作用で相互作用薬になる可能性はないと考えられた。TAF は消化管排出トランス

ポーターである P-gp 及び BCRP の基質であるため、これらトランスポーターの阻害剤及び／又は誘導剤によって TAF の曝露量が影響を受ける可能性がある。また、TAF は肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であるが、肝細胞への TAF の取り込みに対するこれらのトランスポーターの寄与は少なく、TAF の受動的透過性が高いことを考えると、輸送活性の変化は臨床的に意味のある影響を及ぼさないと予想される。TAF は、腎トランスポーターである OAT1 及び OAT3 の基質ではなかったことから、腎尿細管細胞への TFV の輸送には関与しないことが示唆された。そのため、腎細胞における TFV 濃度は血漿中 TFV 濃度と相関すると考えられ、TAF 25 mg 投与後の血漿中 TFV 濃度は TDF 300 mg 投与後に比べて約 90%低い。

以上のことから、TAF は肝抽出率が高く、肝細胞において活性代謝物である TFV-DP に効率的に代謝される。非臨床薬物動態試験での TAF の薬物動態評価によって、B 型慢性肝炎の治療における本剤の使用が裏付けられた。

4　毒性試験

TAF についての非臨床毒性試験の包括的プログラムを実施した。これらの試験により、単回及び反復投与毒性、遺伝毒性、がん原性（TAF に代わり TDF 試験による）及び生殖発生毒性が特徴付けられた。本項で考察された非臨床毒性試験は、臨床試験成績を比較及び解釈するときの、潜在的な TAF の毒性を評価するための十分な根拠を提供している。

4.1　単回投与毒性

ラットに TAF（モノフマル酸塩）を単回経口投与したときの概略の致死量及び無毒性量（NOAEL）はいずれも 1000 mg/kg 超と判断した（試験番号 R990185；2.6.6.2.1 項）。イヌ単回経口投与毒性試験での概略の致死量及び NOAEL はそれぞれ 270 mg/kg 超及び 30 mg/kg と判断した。イヌでは、投薬に関連した一般症状（270 mg/kg 群）及び腎尿細管病変（90 及び 270 mg/kg 群）が観察された（試験番号 D990181；2.6.6.2.2 項）。

4.2　反復投与毒性

TAF の反復経口投与毒性試験は、マウス［2 週間（試験番号 TX-120-2006；2.6.6.3.1 項）及び 13 週間（試験番号 TX-120-2007；2.6.6.3.2 項）］、ラット［4 週間（試験番号 R990182；2.6.6.3.3 項）及び 26 週間（試験番号 TOX-120-001；2.6.6.3.4 項）］、イヌ［4 週間（試験番号 D990175；2.6.6.3.5 項）及び 39 週間（試験番号 TOX-120-002；2.6.6.3.6 項）］及びサル［4 週間（試験番号 P2000114；2.6.6.3.7 項）］を用いて実施された。長期投与試験では、主要な標的臓器は腎臓（巨大核及び尿細管変性）及び骨（骨幹端の海綿骨萎縮）であった。また、ラット及びイヌへの TAF 投与は、骨代謝マーカーを増加させ、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 を低下させると考えられた。

4.2.1　腎臓

TAF のラット及びイヌ経口投与毒性試験では、腎尿細管巨大核が観察された。ラットでは、4 週間投与試験の 400 mg/kg/日群巣状性の極微の腎皮質尿細管の好塩基球増加及びこれに伴う極微の巨大核が、26 週間投与試験の 100 mg/kg/日群に、腎皮質尿細管巨大核が認められた。イヌでは、4 週間投与試験の 3 及び 10 mg/kg/日群並びにイヌ 39 週間投与試験の 13 週間投与以上で 6 又は 18/12 mg/kg/日群に、腎尿細管巨大核及び／又は好塩基球増加が観察された。腎皮質尿細管の変性／再生所見は、イヌ 39 週間投与毒性試験の 13 及び 39 週間投与動物の 6 又は 18/12 mg/kg/日群に限られた。6 mg/kg/日群の雌雄では極微から軽微であった。18/12 mg/kg/日群では軽度から中等度であった。2 mg/kg/日群の雄では、極微な同様の所見（巨大核及び腎尿細管変性）が雄 2 匹に観察されたのみであった。13 週間の休薬期間後、投薬に関連した組織学的変化は腎臓で継続して観察されたものの、発現頻度及び重症度は低減していた。

4.2.2　骨

TAF のラット 26 週間投与試験の 100 mg/kg/日群で、骨幹端の海綿骨萎縮が観察された。TAF はラット 26 週間投与試験の 25 mg/kg/日群以上で、骨代謝マーカーを増加させ、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 を低下させた。また、イヌ 39 週間投与試験で骨密度（BMD）パラメーターの低値が 18/12 mg/kg/日群に認められた。本所見は、体重減少の二次的な変化である可能性があるものの、雄での有意な血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 の低下を伴っていた。

4.2.3　その他

TAF のマウス 13 週間投与試験の 10 mg/kg/日群以上において、鼻粘膜に有害な変性（嗅上皮変性）及び急性炎症（好中球浸潤）が認められた。これらの変化は、ラット、イヌ及びサルではマウスよりも長期間の投与でも認められなかったことから、ヒトへの関連は不明であり、ヒトでの鼻の炎症に対するリスクはきわめて低いものと考えられた。

イヌ 39 週間投与試験において、TAFは 2 mg/kg/日群に心電図（ECG）への影響を認めなかった。6 及び 18/12 mg/kg/日群で、PR間隔の軽微な延長を認めたが、この軽度の変化は一般状態悪化の二次的所見と考えられ、トリヨードサイロニン（T3）の有意な低下を伴った［22、23］。13 週間の休薬期間後、血清T3 値は投与終了時の対照群と同程度の濃度にまで回復した。PR間隔の延長及びその他のECGパラメーターの変化は、100 mg/kgまでのTAF投与による安全性薬理試験（試験番号D2000006；2.6.2.4.2.2 項）及びthorough QT試験（試験番号GS-US-120-0107；2.7.2.2.2.1.1 項）において認められなかった。

イヌ 39 週間投与試験の最高用量である 18/12 mg/kg/日群で、数匹の一部臓器［眼（脈絡叢、毛様体）、肺及び脾臓］に極微の組織球浸潤が認められた。眼科学的検査は正常であった。これらの浸潤細胞は、主に毛様体の血管周囲領域にみられ、網膜毛様体の縁（ヒトでの鋸状縁に相当）にある毛様体と周辺網膜との境界下にある脈絡膜層では比較的少なかった。本所見は両側性にみられ、典型的な発現部位は毛様体の血管周囲及び脈絡膜層と周辺網膜の境界の結合部であったこ

とから、観察された浸潤細胞は、血液－眼関門の維持に広く関わる単核細胞の軽微かつ無秩序な血管周囲浸潤の発現頻度及び程度が増加したものと考えられた。13 週間の休薬期間後のイヌでは単核細胞浸潤は観察されなかったことから、本所見は機能的変化を伴わない投与期間中の血液－眼関門の維持に関連した所見であり、軽微かつ投薬に関連した可逆的な変化であることが示唆された。マウス及びラットにおけるそれぞれ 13 週間及び 26 週間までの反復投与試験並びにサル 4 週間及びイヌ 4 週間投与試験では、眼科学的検査及び眼組織の病理組織学的検査において投薬に関連した影響は認められなかった。[^{14}C]-TAF 投与後の眼への分布をマウス、ラット及びイヌで評価した（試験番号 AD-120-2011、AD-120-2020 及び D990173-BP；2.6.4.4.1 項）。特にメラニン結合性は有色及び白色マウス（C57 黒色及び CD-1）並びにラット［Long Evans（LE）及び Sprague-Dawley（SD）］での分布により、比較検討した。放射能のラット及びイヌの眼への分布は乏しかった（眼の C_{max} は血漿の 8%未満）。低濃度の放射能の一過性曝露がラットの眼で観察されたが、投与 4 時間後では検出限界未満まで低下した。皮膚及び眼を含め、SD ラットと LE ラット間で分布の差は観察されなかったため、メラニンには結合しないことが示唆された。マウスでの[^{14}C]-TAF の眼への分布は、検討した他の動物種よりも高度であった（眼の C_{max} は血漿の 15%～20%）。C57 黒色マウスでの水晶体、ブドウ膜及び眼球における曝露は CD-1 マウスよりも持続した。しかし、有色皮膚及び白色皮膚に分布の差は観察されず、[^{14}C]-TAF 関連放射能はメラニンを含む組織への選択的結合はないことが示唆された。高用量群のイヌの眼で認められた極微の組織球浸潤は、ヒトに TAF 25 mg を投与したときの TAF 及び TFV 曝露量と比較してそれぞれ 9 及び 42 倍高い曝露量で認められ、イヌでの TAF の血液脳関門及び血液網膜関門の透過性は乏しいことが判明していることから、組織分布との関連性はなかった。組織分布試験及び毒性試験で認められた結果に基づき、ヒトでの後部ブドウ膜炎のリスクは極めて低いものと判断される。

TAFはミトコンドリア毒性を誘発する可能性は低いと考えられる。TAFはHepG2 細胞を用いた 10 日間処理試験において最高濃度の 1 μmol/L（TAF 25 mg投与時C_{max}の約 2 倍）まで、mtDNA量に影響を及ぼさなかった（試験番号PC-120-2006；2.6.2.3.2.6.1 項）。TAFの活性代謝物であるTFV-DPは、mtDNAポリメラーゼγにより、天然基質であるATPと比較して高度に区別される（10000 倍超）［24］。以上より、TAFは臨床使用においてmtDNAポリメラーゼγを阻害する可能性は低いと考えられる。

4.3　遺伝毒性

In vitro 試験として細菌株を用いた復帰突然変異試験（*Salmonella typhimurium* 及び *Escherichia coli*、試験番号 V990212；2.6.6.4.1.1 項）及びマウスリンフォーマ細胞を用いた L5178Y 遺伝子突然変異試験（試験番号 V990213；2.6.6.4.1.2 項）を実施した。*In vivo* 試験として、マウス骨髄小核試験（500、1000 及び 2000 mg/kg を経口投与、試験番号 M2000113；2.6.6.4.2.1 項）を実施した。TAF はこれら *in vitro* 及び *in vivo* バッテリー試験で遺伝毒性を示さなかった。

4.4　がん原性

TAF を用いたがん原性試験は実施しなかったが、同じく TFV のプロドラッグである TDF によるマウス及びラット長期経口投与がん原性試験（試験番号 M990205 及び試験番号 R990204；

2.6.6.5 項）が実施されており、がん原性は低いことが示されている。トランスジェニックマウス及びラットに TAF を投与したときの PK データにより、プロドラッグである TAF の血漿中濃度は測定不能であることが示されている（2.6.4.3.2.1 項）。TAF のマウス及びラット反復投与試験では、血漿中に十分量の TFV が認められたが、TDF のがん原性試験で認められた TFV 曝露量と比較すると低値であった。以上のことから、TAF のがん原性も低いと考えられる。

4.5　生殖発生毒性

ラット、イヌ及びサル反復経口投与毒性試験で、生殖器の検査が実施された。ラット及びイヌ長期投与試験並びにサル 4 週間反復投与毒性試験の生殖器の病理組織学的検査及び臓器重量測定に、投薬に関連した所見は認められなかった。

TAF（ヘミフマル酸塩）の経口投与によるラット受胎能及び初期胚発生試験（試験番号 TX-120-2012；2.6.6.6.1.1 項）では、雌雄で用量依存的な体重増加抑制が認められたが、交尾率、受胎率、精子の運動性、精子濃度、黄体数、着床部位数、早期及び後期吸収胚数並びに生存胎児数を含む雄又は雌の受胎能に関する検査項目において、160 mg f.b.e./kg/日［遊離塩基換算（f.b.e）］の投与まで投薬に関連した所見は認められなかった。本試験における雌雄親動物の一般毒性に関する NOAEL は 80 mg f.b.e/kg/日であり、受胎能及び初期胚発生毒性に関する NOAEL は 160 mg f.b.e./kg/日であった。

TAF（モノフマル酸塩）の経口投与によるラット及びウサギ胚・胎児発生試験では、最高用量のそれぞれ 250 mg/kg/日及び 100 mg/kg/日で母動物毒性が認められた（それぞれ、試験番号 TX-120-2002；2.6.6.6.2.2 項及び試験番号 TX-120-2005；2.6.6.6.2.4 項）。ラットでは、一過性の軽微な骨化遅延を伴う胎児体重の低値が、母動物毒性のみられた 250 mg/kg/日で観察された。ラットでの胚・胎児発生に関する NOAEL は、100 mg/kg/日であり、このときの妊娠 17 日の TAF 及び TFV の 0 時間から t 時間までの AUC（$AUC_{0\text{-}t}$）値はそれぞれ 0.2 及び 17.4 μg•h/mL であった。ウサギでの胚・胎児発生への影響は 100 mg/kg/日まで認められず、NOAEL は 100 mg/kg/日であった。このときの妊娠 20 日の TAF 及び TFV の $AUC_{0\text{-}t}$ 値はそれぞれ 11.0 及び 27.3 μg•h/mL であった。

TAF を用いた出生前及び出生後の発生毒性試験は実施しなかった。TDF を用いた出生前及び出生後のラット発生毒性試験において、母動物の生殖能、F_1 世代の出生前及び出生後の発生に関する NOAEL は 150 mg/kg/日であった（試験番号 R990202；2.6.6.6.3 項）。母動物の毒性用量である 450 mg/kg/日以上で胎児死亡、胎児体重及び性成熟に影響が認められた。TAF を長期投与したラットでは、TFV の血漿中濃度の明らかな増加が得られたが、この TFV の曝露量は TDF の出生前及び出生後の発生毒性試験で既に得られている曝露量よりも低値であった［TDF 600 mg/kg/日投与時の曝露量 27.3 μg•h/mL（分娩後 20 日）に対し TAF 100mg/kg/日投与時では最大 15.5 μg·h/mL（試験第 26 週）］。以上のように、本試験で TDF を投与したときの TFV 曝露量は、ヒトでの TAF 投与時の TFV 曝露量（0.322 μg•h/mL）に対して約 100 倍に相当する曝露量で出生前及び出生後の影響が既に評価されている。TFV の出生後の潜在的な毒性は、TDF の出生前及び出生後の発生毒性試験によって明確に特徴付けられている。

4.6　新生児に対する毒性

TAFを用いた新生児に対する毒性試験は実施していない。しかし、SIV感染及び非感染のアカゲザルを用いたTFVの有効性試験が実施されている［25、26、27］。これらの試験では、12 匹の妊娠アカゲザル及び投与開始時の齢数が 1 日齢～7.5 年齢の新生児期から若年期のアカゲザル 85 匹超にTFVが投与された。この齢数は、ヒトでの分娩前、新生児、幼若及び青年の成長上の時期に該当している。投与期間は 12 週間まで（短期）～13 年間（長期）であった。30 mg/kg/日のTFVを長期間、連日皮下投与したアカゲザルのみに、臨床的に意義のある腎臓及び骨の病理所見（BMD低下、関節腫脹及び骨折）が認められた。本投与量でのTFVの曝露量（AUC 150 μg·h/mL）は、TAF 25 mg投与時の臨床曝露量の 496 倍以上高値であった。アカゲザルでの影響は曝露量を減少させるか又は中止することにより可逆性を示した。TFVの低用量投与（10 mg/kg/日、すなわち約 15 μg·h/mL）時では、腎機能不全並びにBMD及び骨成長の異常はみられなかった。

4～30 mg/kg/日の TFV をアカゲザル新生児に短期間（12 週間まで）投与したところ、有害な影響は観察されなかった。しかし、投与期間延長（概して、4 ヵ月間以上 30 mg/kg/日の用量を連日皮下投与）により、糖尿、アミノ酸尿、リン酸尿、発育不全及び骨軟化症を伴うファンコニ症候群が認められた［26］。一般症状、臨床検査及び X 線所見は、投与量の減量（30 mg/kg/日から 10 mg/kg/日未満へ）又は投与中止により、部分的又は完全に回復した。

2 匹に新生児期から長期に 10 mg/kg/日の TFV を皮下投与した。5 年間以上の投与において、一般症状、X 線又は DXA 法による BMD 検査に骨に関する異常は認められなかった［26］。本用量での TFV の AUC（18 μg·h/mL）は、TAF 25 mg 投与時の臨床曝露量の 56 倍であった。

4.7　局所刺激性

刺激性試験において、TAF は腐食性・強度眼刺激性物質でなく（試験番号 TX-120-2013；2.6.6.7.1 項）、半閉塞的条件でのウサギ皮膚刺激性試験で非刺激性・非腐食性であった（試験番号 TX-120-2011；2.6.6.7.2 項）。

4.8　その他の毒性試験

4.8.1　抗原性

TAF はマウス局所リンパ節試験で感作性を示さなかった。（試験番号 TX-120-2014；2.6.6.8.1.1 項）

4.8.2　免疫毒性

TAF の反復投与毒性試験の結果（血液学的検査、リンパ組織重量、リンパ組織の病理組織学的検査及び骨髄細胞充実性）から、TAF の免疫毒性は示唆されなかった。

4.8.3　代謝物

TAF にはヒトに特異的な代謝物がないため、TAF の代謝物に関する独自の毒性試験は実施しなかった。TFV の *in vitro* 遺伝毒性試験結果からは、TFV の遺伝毒性の懸念はなかった（試験番号 95-TOX-1278-006 及び 95-TOX-1278-007；2.6.6.8.4 項）。

4.8.4　不純物／分解生成物

原薬の潜在的不純物の毒性を評価するために、ラット 2 週間及び 4 週間投与安全性確認試験を実施した。最初の試験では、純度 97.7%及び 83.1%の TAF（モノフマル酸塩）の 5 及び 50 mg/kg/日を雄ラットに 14 日間経口投与したとき、忍容性は良好であった（試験番号 TX-120-2008；2.6.6.8.5.1 項）。投薬に関連した所見は認められず、検討した 2 ロット間で差は認められなかった。NOAEL は 50 mg/kg/日（40 mg f.b.e./kg/日）と判断した。

2 つ目の試験では、TAF（ヘミフマル酸塩）を雌雄ラットに少なくとも 28 日間経口投与した（試験番号 TX-120-2021；2.6.6.8.5.2 項）。本試験では、3 種のロットの TAF（ヘミフマル酸塩）をそれぞれ 25 及び 50 mg f.b.e./kg/日の用量で投与した。ロット 1 は純度 99.3%、ロット 2 は 11 種の不純物を添加した純度 98%、ロット 3 は 4 種の不純物を添加した純度 97.8%であった。対照群には、溶媒を投与した。3 種の異なる不純物プロファイルを有する被験物質を 25 及び 50 mg/kg/日の用量でラットに 4 週間強制経口投与したときの忍容性は良好であった。検討した 3 ロット間に意義ある一般状態所見又は病理組織学的な差は認められなかった。全 3 ロットの NOAEL は 50 mg f.b.e./kg/日であった。

これらの不純物プロファイルに基づくと、毒性試験に使用された TAF の GLP バッチは、製造管理及び品質管理に関する基準（GMP）バッチを代表しており、臨床使用予定の製剤の不純物及び分解生成物の規格値を支持すると判断された（2.3.P.5.5 及び 2.3.P.5.6 項）。

4.8.5　光毒性評価

TAF の光毒性試験は必要ではないと判断した。20 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 pH 6.0 での TAF（ヘミフマル酸塩）液の紫外線吸収スペクトルは、最大吸収（λ_{max}）は 205 及び 262 nm であり、262 nm の特徴的ピークにおいて測定したモル吸光係数は $1.5 \times 10^4\ L \cdot mol^{-1} cm^{-1}$ であった（2.3.S.3 項）。TAF（ヘミフマル酸）は自然の太陽光の範囲では光を吸収しないため、光毒性の懸念はないと考えられる。

4.9　毒性の要約及び標的臓器

4.9.1　標的臓器

TAF の一般毒性、遺伝毒性、がん原性及び生殖毒性に明確な懸念は認められなかった。

腎臓

ラットへの経口投与では、腎尿細管巨大核が観察された。ラットでは、4 週間投与試験の 400 mg/kg/日群に巣状性の極微の腎皮質尿細管の好塩基球増加及びこれに伴う極微の巨大核が、

26 週間投与試験の 100 mg/kg/日群に腎皮質尿細管巨大核が認められた。イヌでは、4 週間投与試験の 3 及び 10 mg/kg/日群及びイヌ 39 週間投与試験の 13 週間投与以上で 6 又は 18/12 mg/kg/日群に腎尿細管巨大核及び／又は好塩基球増加が観察された。

腎皮質尿細管の変性／再生所見は、イヌ 39 週間投与毒性試験の 13 及び 39 週間投与動物の 6 又は 18/12 mg/kg/日群に限られた。6 mg/kg/日群の雌雄では極微から軽微であった。18/12 mg/kg/日群では軽度から中等度であった。2 mg/kg/日群の雄では、軽微な同様の所見（巨大核及び腎尿細管変性）が雄 2 匹に観察されたのみであった。13 週間の休薬期間後、投薬に関連した組織学的変化は腎臓で継続して観察されたものの、発現頻度及び重症度は低減していた。

骨

TAF のラット 26 週間投与試験の 100 mg/kg/日群で、骨幹端の海綿骨萎縮が観察された。TAF はラット 26 週間投与試験の 25 mg/kg/日群以上で、骨代謝マーカーを増加させ、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 を低下させた。また、イヌ 39 週間投与試験で BMD パラメーターの低値が 18/12 mg/kg/日群に認められた。本所見は、体重減少の二次的な変化である可能性があるものの、雄における軽微であるが有意な血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 の低下を伴っていた。

その他

TAF のマウス 13 週間投与試験の 10 mg/kg/日群以上において、鼻粘膜に有害な変性（嗅上皮変性）及び急性炎症（好中球浸潤）が認められた。これらの変化は、ラット、イヌ及びサルではマウスよりも長期間の投与でも認められなかったことから、ヒトへの関連は不明であり、ヒトでの鼻の炎症に対するリスクはきわめて低いものと考えられた。

イヌ 39 週間投与試験において、TAF は 2 mg/kg/日群に ECG へ影響を認めなかったが、6 及び 18/12 mg/kg/日群で、PR 間隔の軽微な延長を認めたが、この軽度の変化は一般状態悪化の二次的所見と考えられ、T3 の有意な低下を伴っていた［22、23］。13 週間の休薬期間後、血清 T3 値は投与終了時の対照群と同程度の濃度にまで回復した。PR 間隔の延長及びその他の ECG パラメーターの変化は、100 mg/kg までの TAF 投与による安全性薬理試験において認められなかった。

イヌ 39 週間投与試験の最高用量である 18/12 mg/kg/日群で、数匹の一部臓器［眼（脈絡叢、毛様体）、肺及び脾臓］に極微の組織球浸潤が認められた。眼科学的検査は正常であった。これらの浸潤細胞は、主に毛様体の血管周囲領域にみられ、網膜毛様体の縁（ヒトでの鋸状縁に相当）にある毛様体と周辺網膜との境界下にある脈絡膜層では比較的少なかった。本所見は両側性にみられ、典型的な発現部位は毛様体の血管周囲及び脈絡膜層と周辺網膜の境界の結合部であったことから、観察された浸潤細胞は、血液－眼関門の維持に広く関わる単核細胞の軽微かつ無秩序な血管周囲浸潤の発現頻度及び程度が増加したものと考えられた。13 週間の休薬期間後のイヌでは単核細胞浸潤は観察されなかったことから、本所見は機能的変化を伴わない投与期間中の血液－眼関門の維持に関連した所見であり、軽微かつ投薬に関連した可逆的な変化であることが示唆された。マウス及びラットにおけるそれぞれ 13 週間及び 26 週間までの反復投与試験並びにサル 4 週間及びイヌ 4 週間投与試験では、眼科学的検査及び眼組織の病理組織学的検査において投薬に関連した影響は認められなかった。[^{14}C]-TAF 投与後の眼への分布をマウス、ラット及びイヌ

で評価した。特にメラニン結合性は有色及び白色マウス（C57 黒色及び CD-1）並びにラット（LE 及び SD）での分布により、比較検討した。放射能のラット及びイヌの眼への分布は乏しかった（眼の C_{max} は血漿の 8%未満）。低濃度の放射能の一過性曝露がラットの眼で観察されたが、投与 4 時間後では検出限界未満まで低下した。皮膚及び眼を含め、SD ラットと LE ラット間で分布の差は観察されなかったため、メラニンには結合しないことが示唆された。マウスでの[^{14}C]-TAF の眼への分布は、検討した他の動物種よりも高度であった（眼の C_{max} は血漿の 15%～20%）。

C57 黒色マウスでの水晶体、ブドウ膜及び眼における曝露は CD-1 マウスよりも持続した。しかし、有色皮膚と白色皮膚の間に分布の差は観察されず、[^{14}C]-TAF 関連放射能はメラニンを含む組織への選択的結合はないことが示唆された。高用量群のイヌの眼で認められた極微の組織球浸潤は、ヒトに TAF 25 mg を投与したときの TAF 及び TFV 曝露量と比較してそれぞれ 9 及び 42 倍高い曝露量で認められ、イヌでの TAF の血液脳関門及び血液網膜関門の透過性は乏しいことが判明していることから、組織分布との関連性はなかった。組織分布試験及び毒性試験で認められた結果に基づき、ヒトでの後眼部ブドウ膜炎のリスクは極めて低いものと判断される。

TAF はミトコンドリア毒性を誘発する可能性は低いと考えられる。TAF は HepG2 細胞を用いた 10 日間処理試験において最高濃度の 1 μmol/L（TAF 25 mg 投与時 C_{max} の約 2 倍）まで、mtDNA 量に影響を及ぼさなかった。TAF の活性代謝物である TFV-DP は、mtDNA ポリメラーゼ γ により、天然基質である ATP と比較して高度に区別される（10000 倍超）[24]。ミトコンドリア毒性を示唆する所見は、非臨床及び臨床試験において認められていない。以上より、TAF は臨床使用において mtDNA ポリメラーゼ γ を阻害する可能性は低いと考えられる。

4.9.2　曝露量比

主要な標的臓器における定常状態における AUC（AUC_{ss}）に基づく各種動物のヒトに対する曝露量比を表 2.4-3 に示す。

ラット 26 週間投与、イヌ 39 週間投与及びサル 4 週間投与で、B 型慢性肝炎患者における TAF の推奨臨床用量での TFV 曝露量に対し、それぞれ 12 倍、4 倍及び 18 倍超の曝露量まで毒性所見を認めなかった。

腎臓及び骨に対する作用ではイヌが最も高い感受性を示した。腎臓及び骨への影響に関する NOAEL はサルでは 30 mg/kg/日超であった。ラット及びイヌでは高用量投与において BMD パラメーターの低値が認められたが、臨床的に明らかな骨軟化症所見が観察されたのは、幼若サルに 30 mg/kg/日の TFV を長期間連日皮下投与したときのみであった。本投与量での TFV の曝露量（AUC 150 μg·h/mL）は、成人への TAF 25 mg/日投与時曝露量の 465 倍高値であった。

表 2.4-3.　　各種動物での無毒性量（NOAEL）と比較したときのTAF及びTFVのAUC_{ss}に基づく安全域

Target Organ Effect	Species	Study/Dose Duration	TAF NOAEL (mg/kg/day)	AUC_{ss} (μg·h/mL) NOAEL	Margin Relative to Human AUC_{ss}
				TFV/ TAF	TFV[a]/TAF[b]
Nasal Turbinate Toxicity	Mouse	13 Weeks	<10	<0.215/NC	<0.7/NA
Renal Toxicity	Rat	26 weeks	25	3.8/NC	12/NA
	Dog	39 weeks	2	1.2/0.08	4/0.4
	Monkey	4 weeks	≥30	≥5.9/1.0	>18/5
Bone Mineral Loss	Rat	26 weeks	25	3.8/NC	12/NA
	Dog	39 weeks	2	1.2/0.08	4/0.4
	Monkey	4 weeks	≥30	≥5.9/1.0	>18/5
Fertility[c]	Rat	Up to 10 weeks	160	NA	NA
Embryo fetal development[c]	Rat	12 days	84	17.4/0.2	54/1
	Rabbit	14 days	100	27.3/11	85/51
Perinatal/postnatal[c]	Rat	27 days (Gestation day 7 to Lactation day 20)	150 (TDF)	11.7/NA	36/NA

NA = not applicable; NC = insufficient data to calculate

a　Predicted safety margin for TFV human exposure is based on pooled PK data from TAF Phase 3 pivotal studies GS-US-320-0108 and GS-US-320-0110 where the mean TFV AUC_{ss} = 0.322 μg.h/mL;M2.7.2.3.2. (TAF Population PK Report)

b　Predicted safety margin for TAF human exposure is based on pooled PK data from TAF Phase 3 pivotal studies GS-US-320-0108 and GS-US-320-0110 where the mean TAF AUC_{ss} = 0.216 μg.h/mL; M2.7.2.3.2. (TAF Population PK Report)

c　NOAEL for reproductive endpoints provided; AUC data is for maternal exposure; the peri/postnatal study was conducted with TDF not TAF

5　総括及び結論

総括的な非臨床プログラムは、TAF の有効性及び安全性を支持するものである。

TAF は *in vitro* 及び *in vivo* において標的細胞内に効率的に取り込まれ、速やかに TFV に加水分解された後、リン酸化されて TFV-DP に代謝された。ヒト肝細胞株において、TAF は野生型ジェノタイプ A～H の HBV 臨床分離株に対していずれも強力な抗 HBV 活性を示した。TFV-DP はほ乳類 DNA ポリメラーゼ α、β、δ、ε 及び mtDNA ポリメラーゼ γ に対して極めて弱い阻害作用しか持たず、TDF 及び TFV はいずれもリガンドの宿主タンパク質への結合に対して阻害又は活性化作用を示さなかった。また、TAF は NRTI に関連したミトコンドリア毒性を引き起こす可能性は低いことが示唆された。一連のヒト細胞株及び初代細胞を用いた *in vitro* 試験から、TAF による細胞傷害性は弱いと考えられた。*In vitro* 薬力学的薬物相互作用試験では、TFV 及び既存の N(t)RTI との併用により相加的～弱い相乗的な抗 HBV 作用が認められ、拮抗作用は認められなかった。また、TAF の抗 HBV 活性に対して各種 PI は拮抗作用を示さなかった。これらの結果は、

HBV 感染治療における、TAF と他の抗 HBV 薬との併用療法を支持するものである。以上、一連の非臨床薬力学的試験の結果から、TAF は HBV 感染に対する有効な治療薬となることが期待される。安全性薬理試験では、本剤の臨床使用における懸念を示唆する結果は得られなかった。

TAF 及び TFV は臨床的に意味のある CYP3A の基質、阻害剤又は誘導剤ではない。したがって、薬物代謝酵素を介する薬物相互作用の可能性はない。TAF は UGT1A1 の阻害剤でもなく、*in vitro* 試験での CYP3A に対して認められる弱い阻害作用を除き、CYP の阻害剤でもなかった。TAF は *in vitro* 試験において CYP3A に対する弱い阻害作用を示したが、臨床薬物相互作用試験において CYP3A の基質であるミダゾラム又はリルピビリンの曝露に影響を与えなかったことから、臨床的に意味のある阻害剤ではないと考えられた。また、TAF は、CYP、UGT1A1 又は P-gp の臨床的に意味のある誘導剤ではない。さらに、TAF はトランスポーターを介した薬物相互作用を起こさないと考えられる。一方、TAF は消化管排出トランスポーターである P-gp 及び BCRP の基質であることから、TAF の曝露は消化管排出トランスポーターの阻害剤及び／又は誘導剤によって影響を受ける可能性がある。TAF は、ヒト初代肝細胞では主に CES1 によって加水分解される［4、5］。また、*in vitro* 試験において、主に受動的に、また寄与は少ないが、肝取込みトランスポーターである OATP1B1 及び OATP1B3 によって効率よく肝細胞に取り込まれる［5］。この効率的な肝取り込み及び肝細胞内での代謝によって、*in vitro* 試験で細胞内 TFV-DP 濃度は TFV 添加時に比べて約 120 倍、TDF 添加時に比べて約 5 倍上昇した［5］。このように、TAF は肝への TFV の送達を増加させる。

TAF の組織分布に関連した臨床的に意味のある毒性は観察されなかった。イヌ 39 週間毒性試験では、肝臓、肺、脾臓、骨格筋又は骨髄において実質的な TAF 投与に関連した毒性は観察されなかった。イヌ 39 週間毒性試験では、高用量群で血清 T3 の可逆的な低下がみられたが、甲状腺に TAF 投与に関連した組織病理学的変化は観察されなかった。TAF の非臨床試験情報は、臨床データとの関連で考慮すべきである。肝毒性の兆候／症状は、TAF 投与レジメンを含む臨床試験ではみられなかった（2.7.4 項）。

TFV は、腎排泄によってほぼ除去される。TAF は、腎取り込みトランスポーターである OAT1 及び OAT3 の基質ではなく、TAF は腎尿細管細胞への TFV 負荷に寄与しないことが示唆される。それゆえ、腎細胞中 TFV 濃度は血漿中 TFV 濃度に相関すると考えられる。臨床推奨用量である TAF 25 mg 投与後の血漿中 TFV 濃度は TDF 300 m 投与後より約 90%低い。

長期毒性試験では、腎臓（巨大核、尿細管変性）及び骨（骨幹端海綿骨の萎縮）が主要な標的臓器であった。また、TAF はラット及びイヌにおける投与で骨代謝マーカーの増加、並びに血清中 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 の低下を示した。TAF の遺伝毒性試験は陰性であった。以前に実施された 2 年間がん原性試験試験において TFV のプロドラッグである TDF のがん原性は低いことが示されている。TAF は、生殖発生毒性試験で重大な毒性を示さなかった。

不純物及び分解生成物の毒性試験を実施した結果、潜在的不純物を添加したロットと対照ロットの毒性に毒性学的な差は認められなかった。代謝物については、ヒトに特異的な代謝物が認められなかったことから独立した試験は実施しなかった。

以上のように、TAF の包括的な非臨床薬理／ウイルス学、薬物動態及び毒性試験プログラムを実施した。TAF を用いた出生前及び出生後の発生毒性試験並びにがん原性試験は実施しなかったが、これらの試験は TDF で行われており、TDF で実施されたこれらの試験では、TAF 投与で達成される曝露量より高い TFV の曝露量が得られた。これらの薬剤に基づく十分な非臨床安全性データベースは、さらなる毒性試験でヒトに関連する新たなデータが得られるとは考え難いことを示している。

したがって、本概要で示した非臨床データは、B 型慢性肝炎患者の治療に対して TAF の使用を推奨するものであり、TAF の良好なベネフィット・リスクプロファイルを裏付けるものと考える。

6　参考文献

1　Yokota T, Konno K, Shigeta S, Holý A, Balzarini J, De Clercq E. Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogues of hepatitis B virus DNA synthesis in HB611 cells. Antivir Chem Chemother 1994;5 (2):57-63. (4.3.102)

2　Cherrington JM, Allen SJW, Bischofberger N, Chen MS. Kinetic interaction of the diphosphates of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine and other anti-HIV active purine congeners with HIV reverse transcriptase and human DNA polymerases α, β, and γ. Antivir Chem Chemother 1995;6 (4):217-21. (4.3.18)

3　Lee WA, He G-X, Eisenberg E, Cihlar T, Swaminathan S, Mulato A, et al. Selective intracellular activation of a novel prodrug of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor tenofovir leads to preferential distribution and accumulation in lymphatic tissue. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49 (5):1898-906. (4.3.53)

4　Birkus G, Kutty N, He GX, Mulato A, Lee W, McDermott M, et al. Activation of 9-[(R)-2-[[(S)-[[(S)-1-(Isopropoxycarbonyl)ethyl]amino] phenoxyphosphinyl]-methoxy]propyl]adenine (GS-7340) and other tenofovir phosphonoamidate prodrugs by human proteases. Mol Pharmacol 2008;74 (1):92-100. (4.3.9)

5　Murakami E, Wang T, Park Y, Hao J, Lepist EI, Babusis D, et al. Implications of Efficient Hepatic Delivery by Tenofovir Alafenamide (GS-7340) for Hepatitis B Virus Therapy. Antimicrob Agents Chemother 2015;59 (6):3563-9. (4.3.75)

6　Babusis D, Phan TK, Lee WA, Watkins WJ, Ray AS. Mechanism for Effective Lymphoid Cell and Tissue Loading Following Oral Administration of Nucleotide Prodrug GS-7340. Mol Pharm 2013; 10 (2):459-66. (4.3.3)

7　Gilead Sciences Inc. VIREAD® (tenofovir disoproxil fumarate) tablets, for oral use VIREAD® (tenofovir disoproxil fumarate) powder, for oral use. U.S. Prescribing Information. Foster City, CA. Revised October 2013. (4.3.37)

8　Department of Health and Human Services (DHHS). HHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents Recommends a Fixed-Dose Combination Product of Elvitegravir/Cobicistat/Tenofovir/Emtricitabine as an Alternative Regimen in Antiretroviral Treatment-Naive Individuals with HIV-1 Infection. 2012:1-2. (4.3.26)

9 Eisenberg EJ, He G-X, Lee WA. Metabolism of GS-7340, a novel phenyl monophosphoramidate intracellular prodrug of PMPA, in blood. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2001;20 (4-7):1091-8. (4.3.30)

10 Robbins BL, Wilcox CK, Fridland A, Rodman JH. Metabolism of tenofovir and didanosine in quiescent or stimulated human peripheral blood mononuclear cells. Pharmacotherapy 2003;23 (6):695-701. (4.3.91)

11 Delaney WE, IV, Ray AS, Yang H, Qi X, Xiong S, Zhu Y, et al. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. Antimicrob Agents Chemother 2006;50 (7):2471-7. (4.3.24)

12 McColl DJ, Margot NA, Wulfsohn M, Coakley DF, Cheng AK, Miller MD. Patterns of resistance emerging in HIV-1 from antiretroviral-experienced patients undergoing intensification therapy with tenofovir disoproxil fumarate. J Acquir Immune Defic Syndr 2004; 37(3):1340-50. (4.3.66)

13 Margot NA, Lu B, Cheng A, Miller MD. Resistance development over 144 weeks in treatment-naive patients receiving tenofovir disoproxil fumarate or stavudine with lamivudine and efavirenz in Study 903. HIV Med 2006;7 (7):442-50. (4.3.60)

14 Margot NA, Johnson A, Miller MD, Callebaut C. Characterization of HIV-1 Resistance to Tenofovir Alafenamide In Vitro. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(10):5917-24. (4.3.59)

15 Birkus G, Wang R, Liu XH, Kutty N, MacArthur H, Cihlar T, et al. Cathepsin A is the major hydrolase catalyzing the intracellular hydrolysis of the antiretroviral nucleotide phosphonoamidate prodrugs GS-7340 and GS-9131. Antimicrob Agents Chemother 2007;51 (2):543-50. (4.3.11)

16 Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, Gaman EA, Houston JB, Tremaine LM. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. J Pharmacol Exp Ther 2006;316 (1):336-48. (4.3.77)

17 Zhu HJ, Patrick KS, Yuan HJ, Wang JS, Donovan JL, DeVane CL, et al. Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: clinical significance and molecular basis. American journal of human genetics 2008; 82 (6):1241-8. (4.3.94)

18　Tarkiainen EK, Backman JT, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Schwab M, Niemi M. Carboxylesterase 1 polymorphism impairs oseltamivir bioactivation in humans. Clin Pharmacol Ther 2012; 92 (1):68-71. (4.3.104)

19　Imaoka T, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y. Functional involvement of multidrug resistance associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the renal elimination of the anti-viral drugs, adefovir and tenofovir. Mol Pharmacol 2007;71 (2):619-27. (4.3.42)

20　Cihlar T, LaFlamme G, Fisher R, Carey AC, Vela JE, Mackman R and Ray AS. Novel Nucleotide Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase Inhibitor GS-9148 with a Low Nephrotoxic Potential: Characterization of Renal Transport and Accumulation. Amticomb Agents Chemother 2009 53(1): 150-6. (4.3.22)

21　Cihlar T, Ray AS, Laflamme G, Vela JE, Tong L, Fuller MD, Roy A, Rhodes GR. Molecular assessment of the potential for renal drug interactions between tenofovir and HIV protease inhibitors. Antivir Ther. 2007;12(2):267-72. (4.3.23)

22　Kienle RD, Bruyette D, Pion PD. Effects of thyroid hormone and thyroid dysfunction on the cardiovascular system. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1994;24 (3):495-507. (4.3.49)

23　Tribulova N, Knezl V, Shainberg A, Seki S, Soukup T. Thyroid hormones and cardiac arrhythmias. Vascular pharmacology 2010;52 (3-4):102-12. (4.3.108)

24　Johnson AA, Ray AS, Hanes J, Suo Z, Colacino JM, Anderson KS, et al. Toxicity of antiviral nucleoside analogs and the human mitochondrial DNA polymerase. J Biol Chem 2001;276 (44):40847-57. (4.3.45)

25　Tarantal AF, Marthas ML, Shaw J-P, Cundy K, Bischofberger N. Administration of 9-[2-(R)-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) to gravid and infant rhesus macaques (Macaca mulatta): safety and efficacy studies. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1999; 20 (4):323-33. (4.3.103)

26　Van Rompay KKA, Brignolo LL, Meyer DJ, Jerome C, Tarara R, Spinner A, et al. Biological effects of short-term or prolonged administration of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (tenofovir) to newborn and infant rhesus macaques. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48 (5):1469-87. (4.3.32)

27　Van Rompay KKA, Durand-asselin L, Brignolo LL, et al. Chronic administration of tenofovir to rhesus macaques from infancy through adulthood and pregnancy: summary of pharmacokinetics and biological and virological effects. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52 (9):3144-60. (4.3.13)